

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN
BIOMEDICINA**

ENRIQUECIMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MADRE
CANCERÍGENAS EN BASE A SU CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y
ESTUDIO DE MICRORNAS ESPECÍFICOS: DESARROLLO DE
TERAPIAS SELECTIVAS MEDIANTE FÁRMACOS Y
NANOPARTÍCULAS

Memoria presentada por Dña. Cynthia Morata Tarifa para optar a la mención de
Doctor Internacional por la Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Cynthia Morata Tarifa
ISBN: 978-84-9125-378-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41330>

El doctorando Cynthia Morata Tarifa y los directores de la tesis Juan Antonio Marchal Corrales y María Ángel García Chaves garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 6 de abril de 2015

Director/es de la Tesis

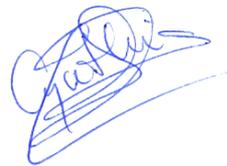


Fdo.: Juan A. Marchal



Fdo.: María Ángel García Chaves

Doctorando



Fdo.: Cynthia Morata

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

Mis directores de tesis, Dr. Juan Antonio Marchal Corrales y Dra. María Ángel García Chaves, por su implicación y aportaciones científicas en el desarrollo de este trabajo, así como a todos los miembros del grupo CTS-963, en especial a Dra. Macarena Perán Quesada.

Al grupo de Química Farmacéutica y Orgánica de la Universidad de Granada, en especial a Dr. Joaquín M^a Campos Rosa, Dra. María Eugenia García Rubiño y Dra. Fátima Morales Marín, así como al grupo de investigación NANOCHEMPIO, en especial a Dra. Rosario Sánchez Martín, Victoria Cano Cortés y Dr. Juan Diego Unciti Broceta, ya que el trabajo desarrollado por estos dos grupos ha sido fundamental para la realización de esta tesis. De igual forma quiero agradecer las aportaciones del laboratorio del Dr. Jose Luis García Pérez de Genyo y Dr. Sanjiv Sam Gambhir de la Universidad de Standford.

A los miembros del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, particularmente a Dr. Gustavo Órtiz Ferrón y Dr. Jose Manuel Entrena Fernández por su participación y criterio en el desarrollo de los experimentos de esta tesis.

A Dra. Joyce M. Slingerland, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en la Universidad de Miami.

A mis compañeros de laboratorio Gema, Elena, Alberto y Carmen con los que tantos momentos he compartido, así como a otros compañeros que aunque no pertenezcan al mismo grupo han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo como Esther, Paola, Gloria, Salva, Macarena, Juan...

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermana, por su apoyo, interés y paciencia mostrada, y a Manuel tanto por su apoyo diario como por su aportación científica.

Gracias a todos aquellos que de alguna u otra manera han aportado algo durante el desarrollo de esta Tesis.

“Todo parece imposible hasta que se hace realidad”

Nelson Mandela (1918-2013)

NOTA

A lo largo del texto se utilizarán las abreviaturas de los términos en inglés debido al uso extendido de dicha lengua en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas de manera cotidiana en el lenguaje científico. Muchos de los acrónimos en inglés son de uso general en ciencia, por lo que para simplificar el texto se mantendrán las abreviaturas en inglés. Al final del texto se incluye un glosario en el que se detalla su significado.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	7
1. CÁNCER: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TUMORALES	9
2. EPIDEMIOLOGÍA	12
3. FACTORES DE RIESGO	17
3.1. CÁNCER DE MAMA	17
3.2. CÁNCER COLORRECTAL	19
3.3. MELANOMA	20
4. HETEROGENEIDAD INTERTUMORAL	21
4.1. CÁNCER DE MAMA	22
4.2. CÁNCER COLORRECTAL	26
4.3. MELANOMA	28
5. HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL: CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	29
5.1. DEFINICIÓN	29
5.2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	30
5.3. AUTORRENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	32
5.3.1. <i>Ruta Notch</i>	32
5.3.2. <i>Ruta Wnt/β-catenina</i>	34
5.3.3. <i>Ruta Hedgehog (Hh)</i>	36
5.4. QUIMIO Y RADIORRESISTENCIA	37
5.5. METÁSTASIS	38

5.6. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN	40
5.6.1. <i>Expresión diferencial de marcadores de superficie</i>	41
5.6.2. <i>Actividad aldehído deshidrogenasa</i>	43
5.6.3. <i>Side Population (SP)</i>	43
6. MICRORNAS Y CÁNCER	43
6.1. DEFINICIÓN, BIOGÉNESIS Y ACCIÓN	43
6.2. MICRORNAs, CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA.	46
7. TRATAMIENTO	48
7.1. CÁNCER DE MAMA	48
7.2. CÁNCER COLORRECTAL	50
7.3. MELANOMA	52
8. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS FRENTE A CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	52
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS	61
MATERIALS AND METHODS	65
1. CELL LINES AND CELL CULTURE	67
2. CELL CRYOPRESERVATION AND RECOVERY	68
3. CELL COUNT	68
4. ISOLATION AND/OR CHARACTERIZATION OF CANCER STEM CELLS	69
4.1. ALDEFLUOR ASSAY	69
4.2. HOECHST 33342 EFFLUX AND DETERMINATION OF THE SIDE POPULATION BY FLOW CYTOMETRY	71

4.3. FLOW CYTOMETRY FOR CELL SURFACE MARKERS EXPRESSION	71
4.4. TUMORSPHERE FORMATION ASSAY	72
4.5. COLONY FORMATION ASSAY	72
5. LENTIVIRUS TRANSFECTION	73
6. XENOGRAFT <i>IN VIVO</i> ASSAY	74
7. EXPERIMENTAL LUNG METASTASIS <i>IN VIVO</i> ASSAY	74
8. HISTOLOGICAL ANALYSIS	74
9. IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS	75
10. GENE EXPRESSION ANALYSIS	75
10.1. BIOINFORMATICS MICRORNAs PREDICTION	75
10.2. TOTAL RNA EXTRACTION	76
10.3. REVERSE TRANSCRIPTION	77
10.4. QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION	77
10.5. DETERMINATION OF STABLE HOUSEKEEPING GENES	79
11. NANOPARTICLES ASSAYS	80
11.1. NANOPARTICLES SYNTHESIS	80
11.3. EFFICIENCY OF NANOPARTICLES INTERNALIZATION	81
11.4. ANTI-MiR-21-5P LOADED NANOPARTICLES ASSAY	81
12. DRUGS AND TREATMENTS	82
12.1. DRUGS	82
12.2. <i>IN VITRO</i> CYTOTOXICITY ASSAYS	84
12.3. FLUORESCENCE DETECTION AND CONFOCAL IMAGING	85

13. CELL CYCLE ANALYSIS	86
14. APOPTOSIS ASSAY	87
15. STATISTICAL ANALYSIS	88
RESULTADOS	89
1. AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES ENRIQUECIDAS EN CÉLULAS CON CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN BASE A SU CAPACIDAD DE ADHESIÓN	91
1.1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES BASADO EN LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN	91
1.2. LAS SUBPOBLACIONES CON MENOR CAPACIDAD DE ADHESIÓN POSEEN CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS RELACIONADAS CON CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS	92
1.3. LAS SUBPOBLACIONES CON MENOR CAPACIDAD DE ADHESIÓN POSEEN UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTORRENOVACIÓN Y MAYOR CLONOGENICIDAD.	97
1.4. LAS CÉLULAS RESISTENTES A UNA SEGUNDA TRIPSINIZACIÓN PRESENTAN NIVELES MUY BAJOS DE ACTIVIDAD ALDH	99
1.5. LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS SENSIBLES A LA TRIPSINA EXPRESAN NIVELES MÁS ALTOS DE GENES ASOCIADOS A EMT Y PLURIPOTENCIA	101
1.6. LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS SENSIBLES A LA TRIPSINA ESTÁ ENRIQUECIDA EN CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES	102
1.7. LA SUBPOBLACIÓN SENSIBLE A LA TRIPSINA TIENE UN MAYOR POTENCIAL METASTÁSICO	104
2. DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TUMORALES Y LÍNEAS NO TUMORALES	107
2.1. ELECCIÓN DE LOS MICRORNAS A ESTUDIAR MEDIANTE PREDICCIONES BIOINFORMÁTICAS	107
2.2. ESTUDIO DEL CORRECTO USO DE NORMALIZADORES PARA EL ANÁLISIS DE MICRORNAS MEDIANTE QRT-PCR RELATIVA	109

2.3. PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN DIFERENTES TIPOS Y SUBPOBLACIONES DE LÍNEAS CELULARES	119
3. USO DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILENO COMO VEHÍCULOS DE ANTI-MICRORNAS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO	120
3.1. EFECTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRE LA CÉLULA	120
3.2. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE ENTRADA DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA SUBPOBLACIÓN ALDH ⁺ DE MELANOMA	123
3.3. EFECTOS DE ANTI-MIR-21-5P VEHICULIZADO POR NANOPARTÍCULAS	126
4. EFECTO DE NUEVOS FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS	127
4.1. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE COMPUESTOS DE PURINA, DERIVADOS DE 5-FU Y P-NITROBENZENOSULFONAMIDAS SOBRE LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS PROCEDENTES DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y MELANOMA	127
4.2. EFECTO DE LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS, DERIVADOS DE PURINA Y P-NITROBENZENOSULFONAMIDAS, SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y MELANOMA	129
4.3. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE COMPUESTOS SELECCIONADOS SOBRE SUBPOBLACIONES ALDH ⁺ DE MELANOMA	132
4.4. DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO DERIVADO DE P-NITROBENZENOSULFONAMIDAS	133
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONS	153
REFERENCIAS	157
APÉNDICE	181
I. PREDICCIONES BIOINFORMÁTICAS DE LOS MICRORNAS SELECCIONADOS	183
II. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	201
III. ANEXO DE PUBLICACIONES	211

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs) are responsible of tumor progression, metastasis, therapy resistance and cancer recurrence, being their identification and isolation of special relevance. Here, we show a new methodology to isolate breast and colon cancer stem-like cells based on their adherence ability to the cell culture surface. Our results demonstrate that trypsin-sensitive (TS) cancer cells subpopulations show increased ALDH activity, higher ability to exclude Hoechst 33342, enlarged proportion of cells with a cancer stem-like cell phenotype and are enriched in sphere- and colony-forming cells. Further studies in MDA-MB-231 breast cancer cells revealed that TS subpopulations express higher levels of *SLUG*, *SNAIL*, vimentin and n-cadherin while show a lack of expression of e-cadherin and claudin, being this profile characteristic of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In the TS subpopulation, *CXCL10*, *BMI1* and *OCT4* were upregulated, being associated their expression with a poor prognosis of cancer. Furthermore, *in vivo* studies in NOD scid gamma (NSG) mice demonstrated that MDA-MB-231 TS cells formed more and bigger xenograft tumors with shorter latency and had higher metastatic potential when were injected in the tail vein.

In addition, we have made bioinformatic analysis in order to select the expression of several microRNAs (miRs) related with CSC phenotype that were finally validated in different subpopulations. In fact, subpopulations selected by differential adhesion capacity differ in the expression of several miRs, such as miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-21-5p, miR-93-5p and/or miR-100-5p, which are also involved in EMT and/or cell self-renewal. Also, colon cancer cell lines, HCT 116 and HT-29, and normal colon cell line, CCD-18Co, differ between them in their miRs expression profile. Both colon cancer cell lines overexpressed miR-142-3p, but miR-15b-5p and miR-590 were only overexpressed in HT-29. In contrast, miR-199a-5p and miR-370 were downregulated in both cancer colon cell lines with respect to CCD-18Co. These different profiles encourage future investigations to use the selected miRs with prognostic and/or therapeutic value in clinic.

The presence of CSCs within tumor is in part responsible of drug resistance to traditional therapies targeting cell with high division rates. Therefore, it is necessary to develop new therapies that target these

subpopulations. We studied the use of innocuous polyethylene nanoparticles (NPs) that can be use for anti-miR delivery. Anti-miR-21-5p loaded NPs diminished melanosphere formation in enriched CSCs subpopulation. Other therapeutic strategy consisted in the development of new compounds against CSCs. In this way, we showed that compounds derivated of *p*-Nitrobenzenosulfonamides were more active that purine and 5-FU derivatives, and they showed a high activity against melanoma CSCs. Drug distribution is critical for the design of more selective and efficient agents in cancer therapy. Fluorescence compounds analyzed in the present work were very useful to elucidate the mechanism of action of drugs inside the cell.

In conclusion, we have developed a non-aggressive, easy, cheap and reproducible methodology to prospectively isolate breast and colon cancer stem-like cells. This study has shown an important point for subsequent biological and preclinical studies, as well as the analysis of specific miR expression profile or the screening of new prospective therapies such as new antiproliferative compounds or NPs linked to therapeutics anti-miRs.

Las células madre cancerígenas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*) son responsables de la progresión tumoral, la metástasis, la resistencia a la terapia antitumoral y la recurrencia, siendo de especial relevancia su identificación y aislamiento. En este trabajo mostramos una nueva metodología de aislamiento de células cancerígenas de colon y mama con características de CSCs en base a su capacidad de adherencia a la superficie de cultivo. Estos resultados demuestran que la subpoblación de células cancerígenas sensibles a la tripsina (TS, del inglés *Trypsin-sensitive*) muestra una mayor actividad ALDH, una mayor habilidad para excluir el colorante Hoechst 33342, una mayor proporción de células con un fenotipo de marcadores superficiales de CSCs y un enriquecimiento en células formadoras de esferas y colonias. Posteriores estudios con la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 revelaron que la subpoblación TS expresa mayores niveles de *SLUG*, *SNAIL*, vimentina y n-cadherina, mientras que muestra una pérdida de expresión de e-cadherina y claudina, siendo este perfil característico del proceso EMT (del inglés *epithelial-mesenchymal transition*). En la subpoblación TS, *CXCL10*, *BMI1* y *OCT4* estaban sobreexpresados, siendo asociada su expresión con un peor pronóstico. Además, estudios *in vivo* en ratones NOD scid gamma (NSG) demostraron que las células TS de la línea celular MDA-MB-231 formaban más y mayores tumores con menor latencia; y poseían un mayor potencial metastásico cuando se inyectaron en la vena de la cola.

Por otro lado, hemos llevado a cabo análisis bioinformáticos con el fin de seleccionar varios microARNs (miRs) relacionados con el fenotipo CSC que fueron finalmente validados en diferentes subpoblaciones. De hecho, las subpoblaciones seleccionadas en base a su capacidad de adhesión difieren en la expresión de algunos miRs, tales como miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-21-5p, miR-93-5p y/o miR-100-5p, los cuales están involucrados en EMT y/o autorrenovación celular. Además, las líneas de cáncer de colon, HCT 116 y HT-29, y la línea celular de colon normal, CCD-18Co, difieren entre ellas en su perfil de expresión de miRs. Ambas líneas cancerígenas de colon mostraban una elevada expresión de miR-142-3p, estando miR-15b-5p y miR-590 únicamente sobreexpresados en la línea HT-29. Por el contrario, miR-199a-5p y miR-370 se encontraron expresados en menor medida en ambas líneas

celulares de colon respecto a la línea CCD-18Co. Estos diferentes perfiles de expresión alientan a futuras investigaciones para el uso de los miRs seleccionados con valor pronóstico y/o terapéutico en el ámbito clínico.

La presencia de CSCs en el tumor es responsable, en parte, de la resistencia a las terapias farmacológicas tradicionales que actúan frente a células con altas tasas de división celular. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas terapias dirigidas frente a estas subpoblaciones. Nosotros hemos estudiado el uso de nanopartículas (NPs) inocuas de polietileno que pueden ser usadas para el transporte de anti-miRs. NPs cargadas con anti-miR-21-5p disminuyeron la formación de melanomas en subpoblaciones enriquecidas de CSCs. Otra estrategia terapéutica que hemos llevado a cabo ha consistido en el desarrollo de nuevos compuestos frente a CSCs. En este sentido, hemos demostrado que los compuestos derivados de *p*-Nitrobenzenosulfonamidas eran más activos que los derivados de purina y 5-FU, y mostraban una mayor actividad frente a CSCs de melanoma. El conocimiento de la distribución celular es crucial para el diseño de agentes más selectivos y eficientes en la terapia frente al cáncer. El compuesto fluorescente analizado en el presente trabajo fue de gran utilidad para elucidar la distribución de este fármaco en el interior celular.

En conclusión, hemos desarrollado una metodología no agresiva, fácil, barata y reproducible para aislar prospectivamente células con características de CSCs de mama y colon. Esto representa un punto importante para posteriores estudios biológicos y preclínicos, como el análisis de perfiles de expresión específicos de miRs o la selección de posibles nuevas terapias como la síntesis de nuevos compuestos antiproliferativos o NPs asociadas a anti-miRs terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TUMORALES

El cáncer se define como un grupo heterogéneo de trastornos con propiedades biológicas muy diferentes, aplicándose este término general para definir a aquellas enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal e incontrolado de las células de un tejido u órgano que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos a través del sistema linfático y la circulación sanguínea mediante un proceso conocido como metástasis (Boyle, Levin et al. 2008).

Las características generales de las células tumorales comprenden ocho capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de los tumores. Estas características comprenden: el mantenimiento de la proliferación, la evasión de los mecanismos supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune (Figura 1) (Hanahan and Weinberg 2011).

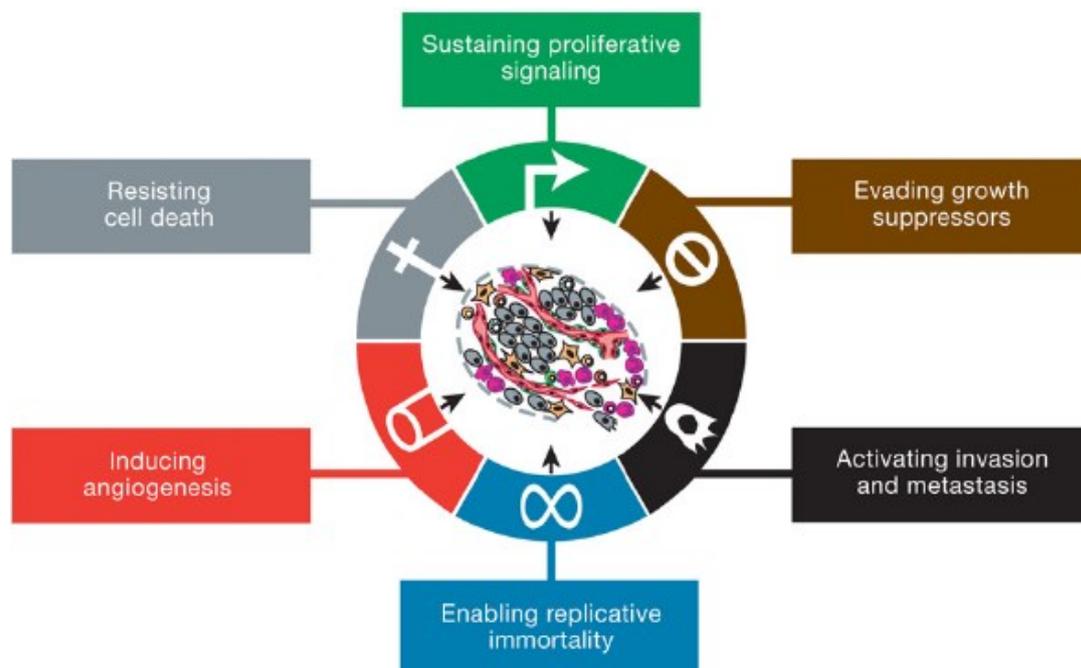


Figura 1. Características generales de las células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011)

Los tejidos normales mantienen un control en la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento, de este modo aseguran una homeostasis entre el número celular y el mantenimiento de la arquitectura y función normal del tejido. Las células cancerígenas desregulan esas señales sosteniendo su proliferación y crecimiento celular incontrolado (Hanahan and Weinberg 2011). Esta autonomía en el crecimiento de las células cancerígenas es debida a:

- (a) sobreexpresión de oncogenes que estimulan el crecimiento celular,
- (b) producción de sus propios factores de crecimiento,
- (c) sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento celular (Sonnenschein and Soto 2013).

Los defectos en mecanismos de regulación que alteran la proliferación celular involucran múltiples oncoproteínas, entre las que se encuentra RAS. El tipo salvaje de la proteína RAS posee una actividad GTPasa intrínseca lenta, es decir, hidroliza GTP a GDP, una reacción favorecida por proteínas activadoras de GTPasa (GAPs, del inglés *GTPase-activating proteins*), las cuales detienen la señalización de RAS mediante un intercambio a un estado de señalización inactivo de unión a GDP. Las mutaciones que disminuyen la actividad GTPasa o inducen una insensibilidad a GAPs resultan en una activación constitutiva de las rutas de señalización, dando lugar a una desregulación en el crecimiento celular, inhibición de la muerte celular, invasividad e inducción de la angiogénesis. Además, el estado alterado de RAS induce alteraciones en la expresión de integrinas y participa en los cambios que producen la migración celular (Ling, Zhao et al. 2014). Sin embargo, señalizaciones excesivamente elevadas de RAS pueden inducir senescencia, un estado no proliferativo pero viable (Figura 2) (Collado and Serrano 2010).

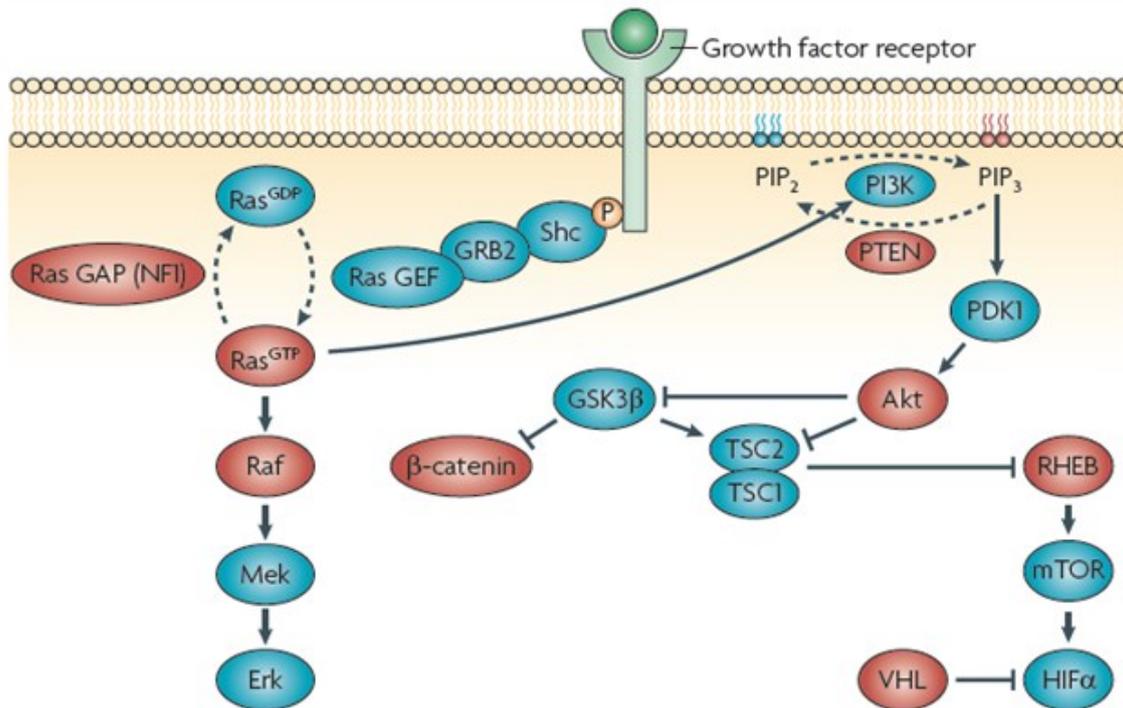


Figura 2. Rutas oncogénicas inductoras de senescencia (Collado and Serrano 2010).

La sobreexpresión y activación desregulada de otra oncoproteína, MYC, también contribuye al desarrollo tumoral (Li, Challagundla et al. 2014; Xue, Zheng et al. 2014). MYC es esencial para el crecimiento y proliferación de las células normales mediante la regulación de la expresión de un gran número de genes involucrados en el ciclo celular, apoptosis, diferenciación, angiogénesis, metabolismo, biogénesis ribosómica y renovación de las células madre. En células normales MYC es regulado en múltiples niveles, sin embargo, esos mecanismos de regulación son eliminados en células cancerígenas (Li, Challagundla et al. 2014).

Además de la capacidad de inducir y mantener las señales de estimulación del crecimiento, las células cancerosas también eluden programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de acciones de proteínas supresoras de tumores (Hanahan and Weinberg 2011), entre las que se encuentran TP53 y RB. TP53 es el supresor de tumores más frecuentemente mutado en cánceres humanos (Shigdar, Li et al. 2014) y está involucrado en el arresto del ciclo celular, apoptosis,

senescencia y diferenciación. Como un factor de transcripción supresor de tumores, TP53 provoca la eliminación de células anormales o estresadas, estimulando las rutas apoptóticas (Kim and Kim 2013; Ye, Zhang et al. 2015). Las mutaciones de TP53 se producen principalmente por la sustitución de un único aminoácido (Saha, Kar et al. 2014), estando fuertemente asociadas las mutaciones inactivantes de TP53 con el incremento del riesgo de padecer cáncer (Kim and Kim 2013). Además, las células cancerígenas pueden inactivar TP53 mediante la sobreexpresión de reguladores negativos de TP53, como MDM2, MDMX y TopBP1 (Chowdhury, Lin et al. 2014). Por su parte, la proteína supresora de tumores RB está involucrada en numerosos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, senescencia y apoptosis (Antonucci, Egger et al. 2014). Esta proteína participa en el punto de control del ciclo celular G₁/S, esencialmente mediante su habilidad para regular la actividad de los factores de transcripción de la familia E2F (Louandre, Marcq et al. 2015).

Otro supresor de tumores es la proteína PTEN, la cual actúa sobre la ruta PI3K/AKT/mTOR desfosforilando PIP3. La pérdida de función de PTEN da lugar a un incremento en el crecimiento celular, proliferación, angiogénesis y supervivencia (Sherman, Maxwell et al. 2014).

2. EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con la OMS, el cáncer causa ahora más fallecimientos que las enfermedades cardíacas coronarias y los infartos cerebrales. En 2012 se estima que hubo 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de fallecimientos por esta causa en el mundo (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015), aumentando tanto el número de casos como de fallecimientos estimados en 2008 (12.7 millones de casos, 7.6 millones de fallecimientos) (Ferlay, Shin et al. 2010).

La mayor proporción de casos (4.1 millones, 29.4% del total) y fallecimientos (2.75 millones, 33.6%) en 2012 ocurren en el Este de Asia por su gran población (1.6 billones, 22% de la población global en 2012). América del

Norte es la segunda en número de casos (1.78 millones, 12.7%), pero tercera (691,000, 6.4%) en términos de fallecimientos por cáncer después del Centro y Sur de Asia (1.0 millones de fallecimientos, 12.5%). Casi un cuarto de los nuevos cánceres (3.44 millones) y una quinta parte de los fallecimientos (1.75 millones) ocurren en las regiones europeas, a pesar de contener el 10% de la población global (Figura 3) (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

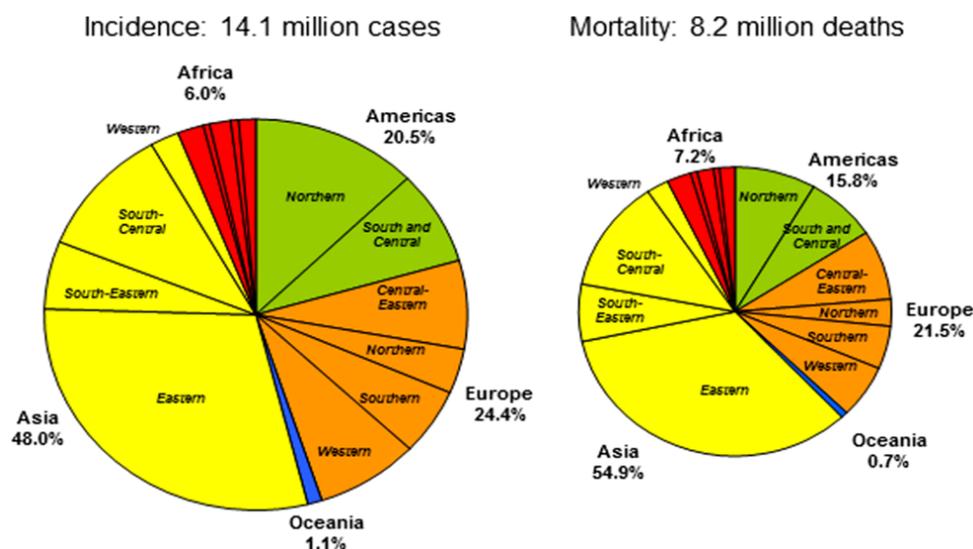


Figura 3. Incidencia y mortalidad mundial estimada en 2012 (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015)

Los cánceres más comúnmente diagnosticados en 2012 fueron los de pulmón (1.82 millones de casos, 1.6 millones de fallecimientos), mama (1.7 millones de casos, 522,000 fallecimientos), colorrectal (1.4 millones de casos, 694,000 fallecimientos), próstata (1.1 millones de casos, 307,000 fallecimientos), estómago (951,000 casos, 723,000 fallecimientos) e hígado (782,000 casos y 745,000 fallecimientos) (Figura 4). Estos seis cánceres representan un 55% de la incidencia global en 2012; aunque en las regiones más desarrolladas solo cuatro cánceres (mama, próstata, pulmón y colorrectal) dan lugar a la mitad de la incidencia total. Los cánceres que causaron más fallecimientos fueron el cáncer de pulmón (1.6 millones), cáncer de hígado (745,000) y cáncer de estómago (723,000). El melanoma de piel dio lugar a 232,000 nuevos casos en el mundo (1.6% de todos los cánceres) y a un 0.7% de todos los fallecimientos por cáncer en 2012 (55,000 fallecimientos), ocurriendo dos de cada tres fallecimientos en las regiones más desarrolladas

(Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). La incidencia de melanoma ha aumentado durante al menos 30 años (DeSantis, Lin et al. 2014), siendo las regiones más afectadas las de población blanca (de origen europeo), con una incidencia mucho más alta en Australia / Nueva Zelanda (40.3 por 100,000 y 30.5 por 100,000, respectivamente) seguidas por América del Norte, Norte de Europa y Europa Occidental (tasas sobre 10 por 100,000), posicionándose como el tercer cáncer más común entre hombres en EEUU (DeSantis, Lin et al. 2014). Por otra parte se observan tasas de incidencia muy bajas en el Sudeste de Asia y Centro-Sur de Asia (inferiores a 0.5 por 100,000) (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

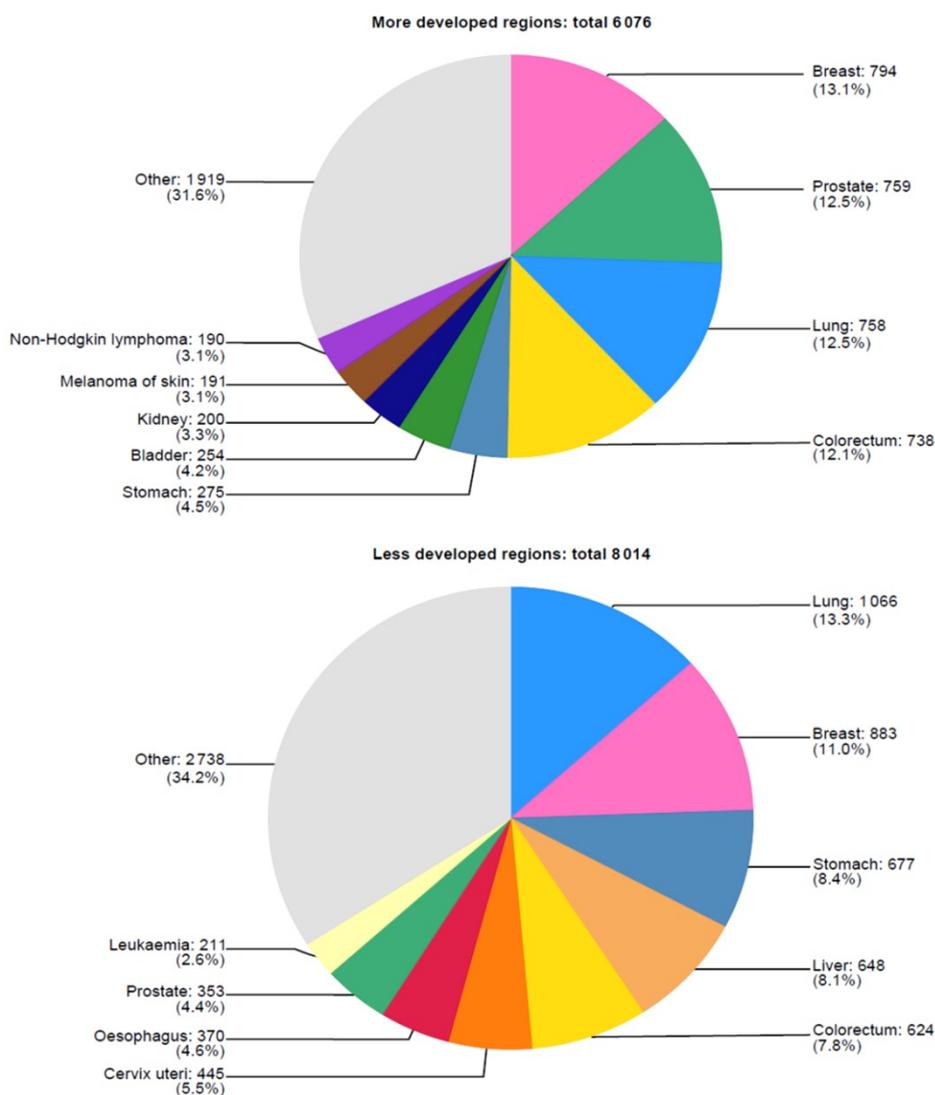


Figura 4. Número de nuevos casos estimados globales en miles de los diferentes cánceres según el nivel de desarrollo (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015)

Aunque el cáncer de pulmón es el cáncer más común en el mundo entre hombres, es el segundo en las regiones más desarrolladas (490,000 casos) después del cáncer de próstata (759,000 casos). En las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer más comúnmente diagnosticado en el mundo, sin embargo el cáncer de pulmón es ahora la mayor causa de muerte entre mujeres en regiones más desarrolladas (210,000) seguido por el cáncer de mama (198,000) (Figura 5). (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

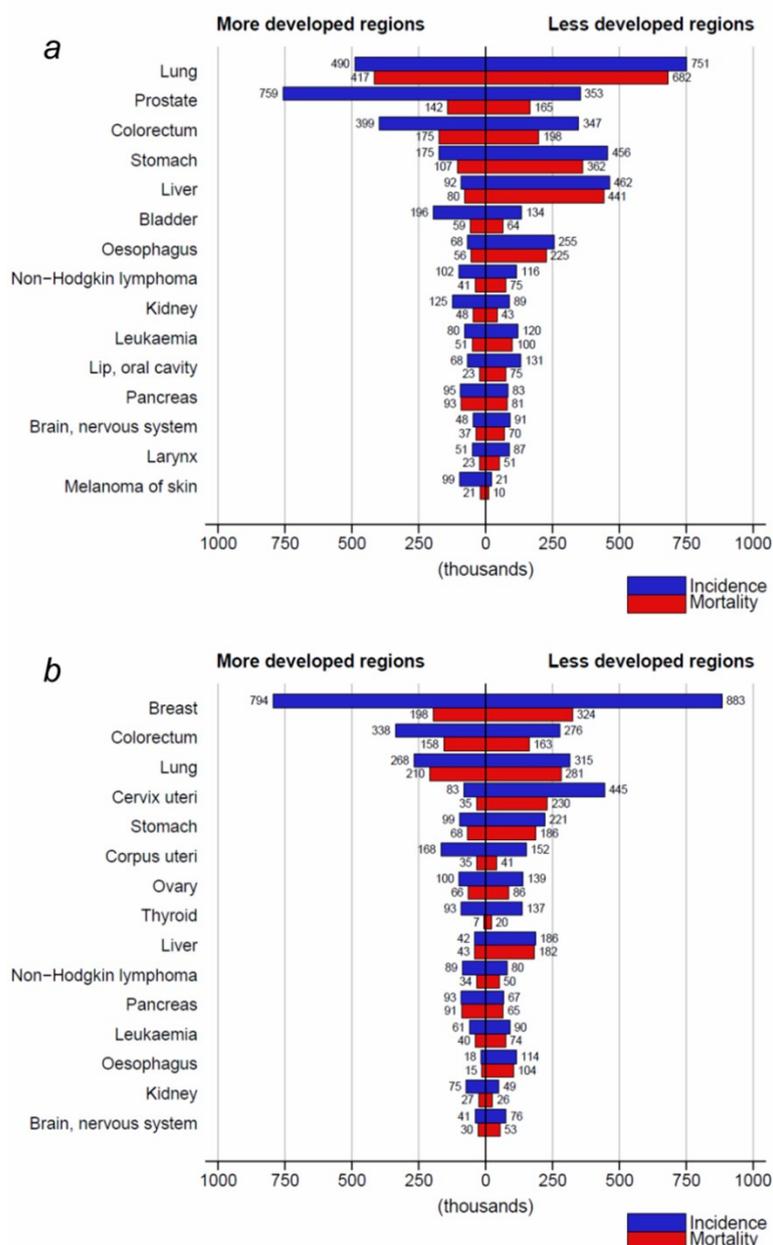


Figura 5. Número estimado en miles de nuevos casos (incidencia) y fallecimientos en (a) hombres y (b) mujeres en regiones más y menos desarrolladas en el mundo en 2012 (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

Globalmente, el 47% de todos los tumores malignos ocurren en personas de más de 65 años. La mortalidad asociada a cáncer también incrementa con la edad, así el 55% de todos los fallecimientos debidos a cáncer ocurren en personas de más de 65 años (Figura 6 y 7) (Boffetta, Bobak et al. 2014).

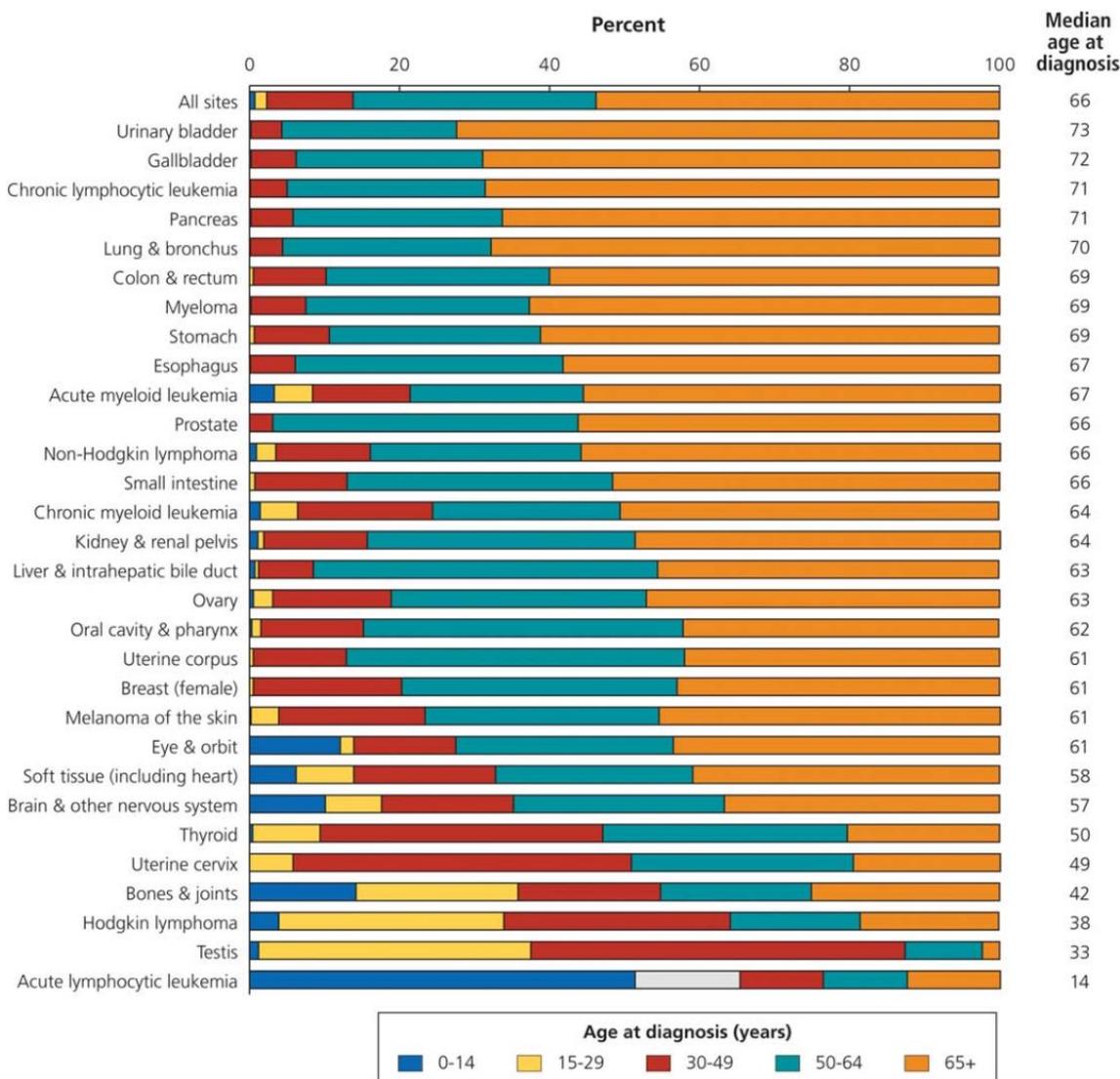


Figura 6. Distribución de la edad de nuevos casos de cáncer y edad media de diagnosis (DeSantis, Lin et al. 2014).

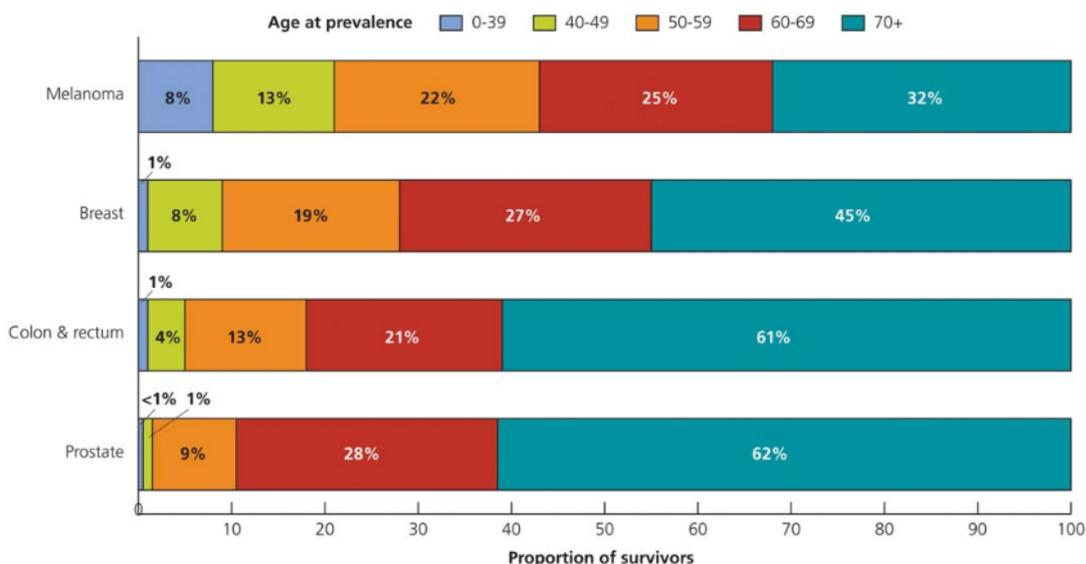


Figura 7. Distribución de la edad de los supervivientes en tipos seleccionados de cánceres (DeSantis, Lin et al. 2014).

3. FACTORES DE RIESGO

3.1. CÁNCER DE MAMA

Numerosos estudios relacionan la vida reproductiva con el riesgo de padecer cáncer de mama. Una edad temprana de menarquía, la nuliparidad y una edad avanzada en el primer nacimiento han sido relacionadas con el riesgo de padecer cáncer de mama. Sin embargo, estos factores de riesgo difieren en los diferentes tipos moleculares de cáncer de mama. Una edad temprana de menarquía (≤ 12 años), la nuliparidad y una mayor edad en el primer nacimiento son más frecuentes en las pacientes con tumores positivos para los receptores de hormonas (Yang, Chang-Claude et al. 2011; Anderson, Schwab et al. 2014). Igualmente una edad avanzada de menopausia es asociada con los cánceres de mama positivos para los receptores de hormonas. Un corto intervalo entre la primera menarquía y el primer embarazo fue inversamente asociado con los cánceres de mama positivos para los receptores de hormonas (Anderson, Schwab et al. 2014). Además, el parto y los múltiples nacimientos son asociados con una reducción en el riesgo de padecer cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos (ER, del inglés *estrogen receptor*) y un

incremento en el riesgo de tumores negativos para ER, específicamente basales o triple negativos. El efecto combinado de una edad temprana en el primer nacimiento y la falta de lactancia aparece como un especial factor de riesgo para los cánceres subtipo basal (Anderson, Rosenberg et al. 2014).

La obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) es otro factor de riesgo con efectos duales según la edad de diagnóstico y el estado de ER, el cual está posiblemente mediado a través del metabolito del colesterol (27-hidroxicolesterol). El peso corporal tiene una asociación directa con el cáncer de mama posmenopáusico y una relación inversa con el cáncer de mama premenopáusico. La obesidad también tiene una asociación positiva más fuerte con los cánceres positivos a receptores de hormonas, aunque también puede incrementar el riesgo de cánceres de mama basales, triple negativos e inflamatorios (Anderson, Rosenberg et al. 2014). La obesidad en mujeres jóvenes (≤ 50 años) es más frecuente en tumores negativos para ER y para el receptor de progesterona (PR, del inglés *progesterone receptor*) que en tumores ER^+/PR^+ , mientras que la obesidad en mujeres mayores (>50 años) es menos frecuente en tumores PR^- que en PR^+ . (Yang, Chang-Claude et al. 2011).

Otros factores de riesgo definidos por la IARC son la exposición a radiaciones X y γ , la terapia menopáusica con estrógenos-progesterona, el uso de anticonceptivos, y el dietilestilbestrol, un estrógeno sintético (Cogliano, Baan et al. 2011). Otros factores relacionados con el estilo de vida también han sido relacionados con el riesgo de padecer cáncer. Así, el ejercicio reduce el riesgo de padecer cáncer de mama (Friedenreich, MacLaughlin et al. 2014), mientras que el consumo de alcohol (Cogliano, Baan et al. 2011; Chen, Rosner et al. 2011) y el tabaco se asocian con un incremento en el riesgo. Las células epiteliales de la mama pueden metabolizar y activar los compuestos carcinogénicos del tabaco capaces de dañar el ADN. Además, el tabaco incrementa la frecuencia de mutaciones de *TP53* en tumores de mama. En contraste, tiene un efecto antiestrogénico, pudiendo enmascarar o atenuar su potencial carcinogénico (Catsburg, Miller et al. 2014).

Otro tipo de factor de riesgo es la susceptibilidad genética, así el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa si se tienen parientes de primer

grado a los cuales se les ha diagnosticado cáncer de mama a una edad temprana o más de un pariente diagnosticado con cáncer de mama (Metcalf, Lubinski et al. 2010). Varios *loci* contribuyen al riesgo de padecer cáncer de mama familiar, entre los cuales los más significativos son las mutaciones deletorias de los genes supresores tumorales *BRCA1* y *BRCA2*. Las mutaciones de los genes *BRCA* se heredan de forma autosómica dominante. Cuando el ADN está dañado, la proteína BRCA1 es recluida en sitios de rotura de la doble cadena del ADN e inicia la reparación modificando la estructura local de la cromatina, pudiendo acceder otras proteínas de reparación del ADN al sitio dañado. La proteína BRCA2 es parte del complejo de reparación del ADN por recombinación homóloga. El complejo repara las roturas de la doble cadena por recombinación homóloga a través de la interacción con RAD51, un componente clave de la ruta de reparación de la doble cadena. En ausencia de BRCA2 en cada ciclo se acumulan errores en la reparación y la replicación. Células que tienen mutaciones inactivantes de *BRCA1* o *BRCA2* son incapaces de reparar el daño del ADN en los sucesivos ciclos y eventualmente mueren. Algunas células supervivientes acumulan anomalías cromosómicas que permiten mutaciones adicionales y a menudo ocurren en genes esenciales del control de activación del ciclo celular, resultando en la formación del tumor (Mohamad and Apffelstaedt 2008). Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* se asocian principalmente con cánceres ER⁻ y ER⁺, respectivamente (Anderson, Rosenberg et al. 2014). Otras mutaciones genéticas también han sido asociadas con la susceptibilidad a padecer cáncer de mama, entre las que se encuentran mutaciones en los genes *CCDN1*, *RAD51B* o *PEX14* (Michailidou, Hall et al. 2013).

3.2. CÁNCER COLORRECTAL

La dieta y el estilo de vida influyen en el riesgo de cáncer colorrectal (CCR), así el consumo de comida altamente calórica rica en grasas animales combinada con un estilo de vida sedentario aumentan la probabilidad de padecer este tipo de cáncer (Aaltonen, Hamilton et al. 2000). El tabaco y el consumo de alcohol también se han indicado como factores de riesgo

(Aaltonen, Hamilton et al. 2000; Cogliano, Baan et al. 2011). Otros factores de riesgo son las radiaciones X y γ (Cogliano, Baan et al. 2011), y la inflamación crónica (Morioka, Miyoshi-Imamura et al. 2014). Entre las asociaciones inversas se incluyen el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroideos, terapias de reemplazamiento esteroideas, la actividad física y el consumo de vegetales (Aaltonen, Hamilton et al. 2000).

Del mismo modo, la susceptibilidad genética constituye otro factor de riesgo. El CCR hereditario se categoriza en general como polipósico, siendo los más comunes la poliposis adenomatosa familiar (FAP, del inglés *familial adenomatous polyposis*) y la poliposis asociadas a MUTYH (MAP, del inglés *MUTYH-associated polyposis*), y no polipósicos, entre los cuales el más común es el síndrome de Lynch (Esplin and Snyder 2014).

FAP es el segundo CCR hereditario más común con una prevalencia estimada de 1:10,000, causado por la mutación en APC en la línea germinal, un supresor de tumores que actúa regulando la cascada de señalización Wnt, mediante la degradación de β -catenina (Esplin and Snyder 2014). MAP es causada por las mutaciones bi-alélicas hereditarias en MUTYH, una proteína involucrada en la reparación del daño del ADN por oxidación, previniendo la transversión de G:C a T:A (Isoda, Nakatsu et al. 2014).

El síndrome de Lynch es el CCR hereditario más común. Este síndrome es una enfermedad autosómica dominante responsable de aproximadamente el 3% de todos los cánceres de colon. Este síndrome es caracterizado por su heterogeneidad genética y es asociado con mutaciones en genes de reparación (MMR, del inglés *mismatch repair*) (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), involucrados en el mantenimiento del material genético, reparando errores en la síntesis de ADN y roturas en la doble cadena, y en la regulación del ciclo celular (Hegde, Ferber et al. 2014).

3.3. MELANOMA

Los mayores factores de riesgo de melanoma son la historia familiar, múltiples lunares, piel clara, inmunosupresión y radiación ultravioleta. El mayor

riesgo viene dado por una exposición intensa intermitente a radiación UV y quemaduras severas durante la niñez (Lo and Fisher 2014). Aunque la alta exposición solar en la niñez es el principal determinante, múltiples quemaduras solares y una alta exposición a lo largo de la vida dan lugar a un riesgo significativo (LeBoit, International Academy of Pathology. et al. 2006).

La radiación UV tiene múltiples efectos en la piel, incluyendo cambios genéticos, inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), alteraciones en la función inmune cutánea y producción de factores de crecimiento (Lo and Fisher 2014). Los melanomas cutáneos que aparecen en la cabeza y la nuca se relacionan con una exposición crónica al sol, mientras que los que aparecen en el tronco ocurren en personas con nevus melanocíticos. Un alto número de nevus reflejan una predisposición innata a la proliferación melanocítica y estimulación por exposición solar. El riesgo de melanoma acral se incrementa también por la exposición a rayos UV y a químicos de la agricultura. La exposición solar ocupacional, especialmente la agricultura, es asociada con el riesgo de melanoma ocular. Además, mutaciones heredadas de genes supresores de tumores como *CDKN2A* están fuertemente asociados con el melanoma familiar, aunque solo representan menos de 1% del melanoma cutáneo total (LeBoit, International Academy of Pathology. et al. 2006).

4. HETEROGENEIDAD INTERTUMORAL

Existe una gran variabilidad entre tumores del mismo órgano, hecho al cual nos referimos como heterogeneidad intertumoral. Esto hace que aparezcan una gran cantidad de subtipos que son caracterizados según su perfil molecular, junto con su morfología y la expresión de marcadores específicos, lo que también supone diferencias en la respuesta terapéutica (Visvader 2011).

El grado y estadio tumoral son importantes en la elección del tratamiento y predicción de la prognosis. El grado histológico combinado con los parámetros histológicos, en particular el grado de displasia, refleja la agresividad del tumor. El grado es clasificado numéricamente (1-4) o descriptivamente (“alto-grado” o “bajo-grado”). El mayor grado numérico se refiere a tumores menos diferenciados, mientras que un cáncer de bajo grado es normalmente bien diferenciado. El sistema de clasificación TNM, desarrollado y mantenido por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) es la herramienta más comúnmente usada para clasificar la extensión de propagación del cáncer. Esta clasificación está basada en la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de nódulos linfáticos metastásicos regionales (N) y la ausencia o presencia de metástasis distantes (M) (Boyle and Levin, 2008).

4.1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es un grupo heterogéneo complejo de enfermedades, un espectro de varios subtipos con distintas características biológicas que deja diferencias en los patrones de respuesta a diferentes tratamientos. Estos tipos moleculares se clasifican principalmente en base a la presencia o ausencia de receptores de hormonas sexuales (ER/PR), dentro de los cuáles existe una gran variedad molecular y genética.

- i) **ER⁺/PR⁺**. Aproximadamente un 75% de los cánceres son positivos para ER y/o PR y se caracterizan por la expresión de proteínas típicas de células del epitelio luminal. Este subtipo tumoral se divide en dos grupos predominantes, Luminal-A y Luminal-B.

Luminal-A: es el más común y representa el 50-60% de todos los cánceres de mama. Este subtipo se caracteriza por unos altos niveles de ER y bajos niveles de genes de proliferación. Expresan citoquinas epiteliales luminales 8 y 18, y otros marcadores luminales, incluyendo ER1, y presentan una baja expresión de Ki67.

Luminal-B: comprenden el 15-20% de los cánceres de mama y tienen un fenotipo más agresivo y mayor índice proliferativo, con una mayor expresión de genes de proliferación que el subtipo Luminal-A, como *MYB*, *GGH*, *LAPTMB4*, *NSEP1* y *CCNE1* (Yersal and Barutca 2014).

En un estudio a partir de 466 tumores, los tumores del subtipo Luminal-A mostraron una mayor incidencia de mutaciones que los tumores del subtipo Luminal-B, entre los cuales los más significativos fueron *PIK3CA* (49%), *TP53* (12%), *GATA3* (14%), *MAP3K1* (14%), además de una ganancia de *CDK4* (14%), así como una alta expresión de *RB1*. Por su parte los tumores del subtipo Luminal-B mostraron mutaciones en *PIK3CA* (32%), *TP53* (32%), *MAP3K1* (5%). También se observó una pérdida en *INPP4B* tanto en tumores del subtipo Luminal-A (9%) como Luminal-B (16%) (2012).

- ii) **Subtipo HER2⁺**. Este subtipo de cánceres positivos para HER2 comprenden un 15-20% de los cánceres de mama. Estos tumores se caracterizan por una alta expresión del gen *HER2*, el cual confiere más agresividad biológica, y otros genes asociados como *GRB7*. Estos tumores son altamente proliferativos, el 75% tienen un grado histológico y nuclear alto y más del 40% tienen *TP53* mutado. Cerca de la mitad de los cánceres de mama positivos para HER2 son positivos para ER, pero generalmente expresan bajos niveles de ER (Sorlie, Perou et al. 2001; Yersal and Barutca 2014).
- iii) **Subtipo basal**. Este subtipo de cánceres con características basales están asociados a tumores con un alto grado histológico y nuclear, baja formación tubular y la presencia de zonas centrales fibróticas o necróticas, una alta infiltración linfocítica y características medulares con unos índices mitóticos y proliferativos muy elevados. La mayoría de estos tumores son tumores ductales infiltrantes, con una alta tasa de metástasis a cerebro y pulmones (Yersal and Barutca 2014). Estos tumores expresan altos niveles de marcadores mioepiteliales basales, como CK5, CK6, CK14, CK17 y laminina (Sorlie, Perou et al.

2001; Yersal and Barutca 2014). No expresan ER, PR y HER2, por lo que también se nombran como triple-negativos, aunque estos términos no son completamente sinónimos, ya que el término triple-negativo se refiere a la ausencia de la expresión de las proteínas ER, PR y HER2, mientras que el subtipo basal se define en base a su expresión génica. También sobreexpresan p-cadherina, fascina, caveolinas 1 y 2, α - β cristalina y *EGFR*. Los cánceres basales presentan una alta frecuencia de mutaciones en *TP53*, inestabilidad e inactivación de la ruta del RB. Varios genes relacionados con el subtipo basal están implicados en la proliferación, supervivencia, migración e invasión celular, como *MAPK*, *PI3K*, *AKT* y *NF-kB*, estando comúnmente desregulados. Este subtipo constituye $\frac{3}{4}$ de los cánceres relacionados con la proteína BRCA1. Los cánceres BRCA1 son positivos frecuentemente para citoqueratinas basales Ki67, TP53, EGFR y p-cadherina, y anomalías en el cromosoma X. (Yersal and Barutca 2014).

En la Tabla 1 se muestran las principales diferencias a nivel génico y proteico de estos subtipos en un estudio realizado con 466 tumores (2012).

Tabla 1. Características genómicas y proteómicas de los diferentes subtipos a partir de 466 tumores (2012).

Subtype	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2E
ER ⁻ /HER2 ⁻ (%)	87	82	10	20
HER2 ⁺ (%)	7	15	2	68
TNBCs (%)	2	1	80	9
TP53 pathway	<i>TP53</i> mut (12%); gain of <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (32%); gain of <i>MDM2</i> (31%)	<i>TP53</i> mut (84%); gain of <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (75%); gain of <i>MDM2</i> (30%)
PIK3CA/PTEN pathway	<i>PIK3CA</i> mut (49%); <i>PTEN</i> mut/loss (13%); <i>INPP4B</i> loss (9%)	<i>PIK3CA</i> mut (32%); <i>PTEN</i> mut/loss (24%); <i>INPP4B</i> loss (16%)	<i>PIK3CA</i> mut (7%); <i>PTEN</i> mut/loss (35%); <i>INPP4B</i> loss (30%)	<i>PIK3CA</i> mut (42%); <i>PTEN</i> mut/loss (19%); <i>INPP4B</i> loss (30%)
RB1 pathway	Cyclin D1 amp (29%); <i>CDK4</i> gain (14%); low expression of <i>CDKN2C</i> ; high expression of <i>RB1</i>	Cyclin D1 amp (58%); <i>CDK4</i> gain (25%)	<i>RB1</i> mut/loss (20%); cyclin E1 amp (9%); high expression of <i>CDKN2A</i> ; low expression of <i>RB1</i>	Cyclin D1 amp (38%); <i>CDK4</i> gain (24%)
mRNA expression	High ER cluster; low proliferation	Lower ER cluster; high proliferation	Basal signature; high proliferation	HER2 amplicon signature; high proliferation
Copy number	Most diploid; many with quiet genomes; 1q, 8q, 8p11 gain; 8p, 16q loss; 11q13.3 amp (24%)	Most aneuploid; many with focal amp; 1q, 8q, 8p11 gain; 8p, 16q loss; 11q13.3 amp (51%); 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploid; high genomic instability; 1q, 10p gain; 8p, 5q loss; <i>MYC</i> focal gain (40%)	Most aneuploid; high genomic instability; 1q, 8q gain; 8p loss; 17q12 focal <i>ERBB2</i> amp (71%)
DNA mutations	<i>PIK3CA</i> (49%); <i>TP53</i> (12%); <i>GATA3</i> (14%); <i>MAP3K1</i> (14%)	<i>TP53</i> (32%); <i>PIK3CA</i> (32%); <i>MAP3K1</i> (5%)	<i>TP53</i> (84%); <i>PIK3CA</i> (7%)	<i>TP53</i> (75%); <i>PIK3CA</i> (42%); <i>PIK3R1</i> (8%)
DNA methylation	-	Hypermethylated phenotype for subset	Hypomethylated	-
Protein expression	High oestrogen signalling; high MYB; RPPA reactive subtypes	Less oestrogen signalling; high FOXM1 and MYC; RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and INPP4B loss signature (pAKT)	High protein and phospho-protein expression of EGFR and HER2

Percentages are based on 466 tumour overlap list. Amp, amplification; mut, mutation.

Uno de los subtipos de los cánceres triple-negativos son los cánceres bajos en claudina. Este subtipo es caracterizado por una baja expresión de genes involucrados en las adhesiones celulares incluyendo las claudinas 3, 4 y 7, ocludina y e-cadherina, mostrando una alta expresión de genes de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial to mesenchymal transition*) y características de células madre. Estos tumores tienen un peor desarrollo clínico que otros tumores triple-negativos (Figura 8) (Sabatier, Finetti et al. 2014; Yersal and Barutca 2014).

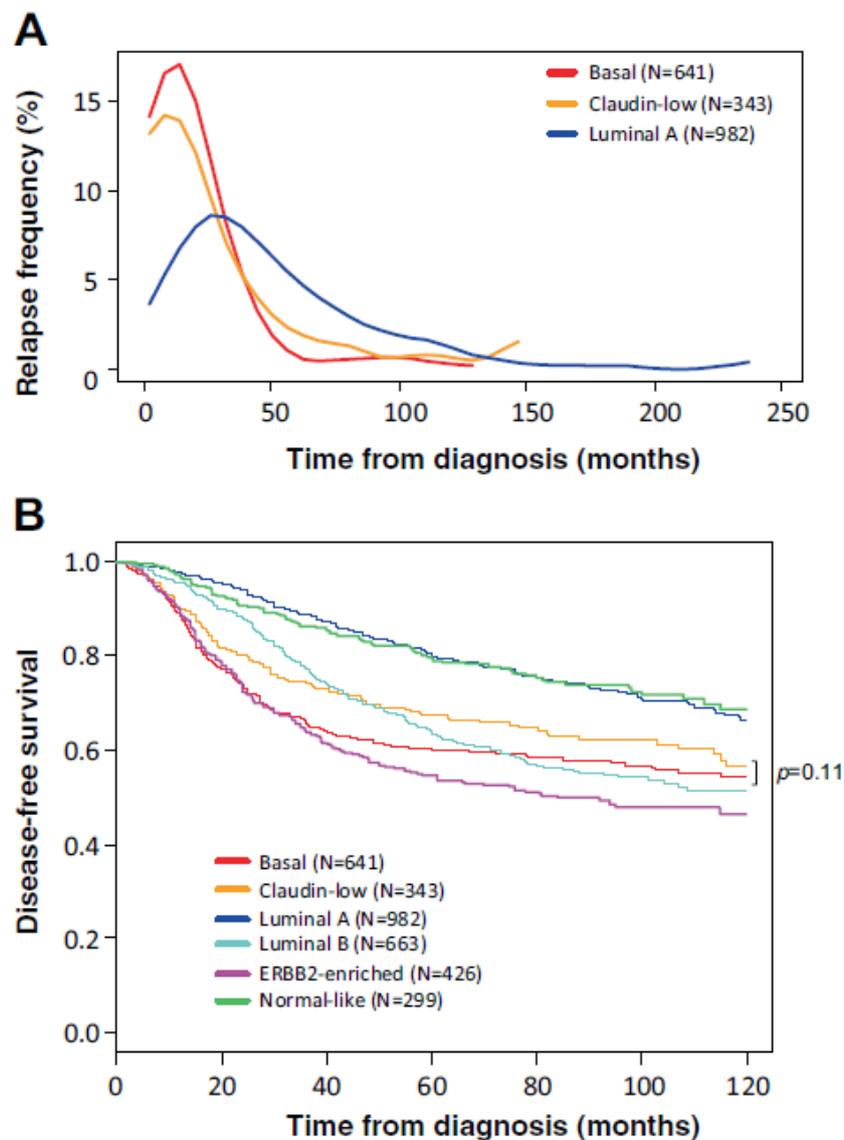


Figura 8. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a los diferentes subtipos moleculares **(A)** Frecuencias de recaídas según el tiempo desde diagnóstico entre Luminal-A, Basal y bajos en claudina. **(B)** Curvas de recaídas en los 6 subtipos (Sabatier, Finetti et al. 2014)

Además, estos subtipos moleculares de cáncer de mama tienen una diferente edad de diagnóstico. El cáncer de mama es diagnosticado a una edad media de 61 años, siendo aproximadamente el 20% de los cánceres de mama diagnosticados en mujeres menores de 50 años y el 43% en mujeres a partir de los 65 años. Además, el 61% de los cánceres de mama son diagnosticados en el estadio 4 (DeSantis, Lin et al. 2014). Los cánceres basales tienen un pico de diagnóstico cerca de los 50 años. Los Luminales A y B tienen una distribución bimodal de diagnóstico principalmente cerca de los 50 y 70 años. Combinando los tumores HER2⁺ y Luminales en un grupo de tumores no basales el pico de diagnóstico se encuentra cerca de los 70 años (Figura 9) (Anderson, Rosenberg et al. 2014).

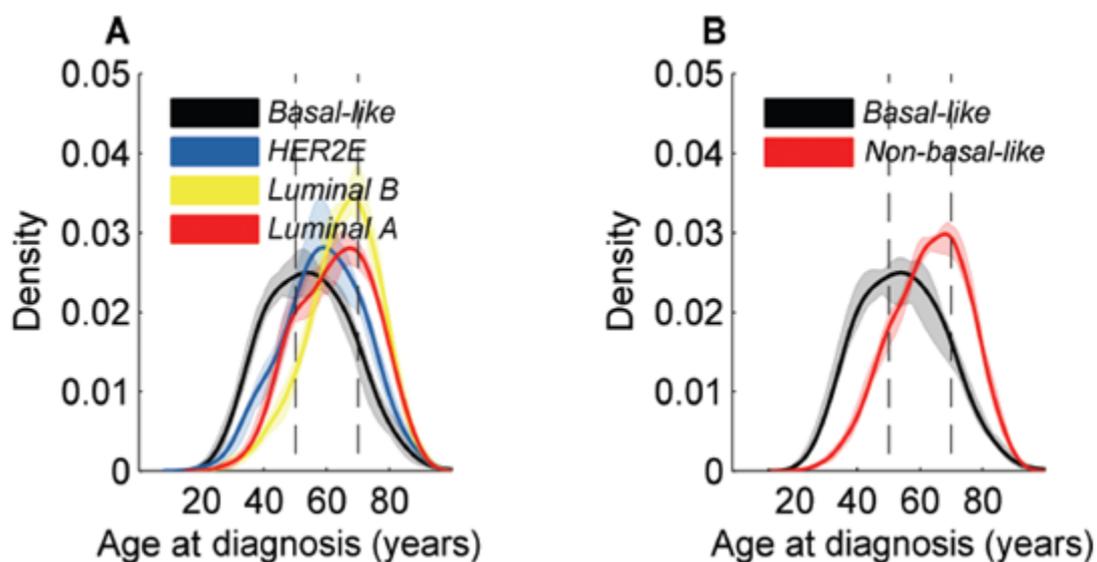


Figura 9. Edad media de diagnóstico de tumores de los subtipos (A) Basales, HER2⁺ (HER2E) y Luminales (B) Basales y no basales, a partir de aproximadamente 2000 tumores de mama. (Anderson, Rosenberg et al. 2014).

4.2. CÁNCER COLORRECTAL

En lo referente a la clasificación molecular de los distintos subtipos de CCR, existen tres subtipos principales (CCS, del inglés *cancer subtypes*) que están caracterizados por distintas características epigenéticas y clínicas. Los tumores CCS1 están caracterizados por mutaciones en los genes *KRAS* y *TP53*, una alta señalización de la cascada Wnt y una marcada inestabilidad

cromosómica (CIN, del inglés *chromosomal instability*). Los cánceres CCS2 están fuertemente enriquecidos en inestabilidad de los microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*)/islas CpG metiladas (CIMP, del inglés *CpG island methylator phenotype*) con una gran infiltración de células inmunes que están normalmente localizadas en el colon ascendente. Por último, los tumores CCS3 presentan MSI y CIN, pero además están enriquecidos en mutaciones de *BRAF* y *PIK3CA* y tienen un fenotipo mesenquimal. Los tumores CCS1 y CCS2 se caracterizan por una mejor evolución de la enfermedad, mientras que los tumores CCS3 tienen un peor pronóstico (Figura 10) (Linnekamp, Wang et al. 2015).

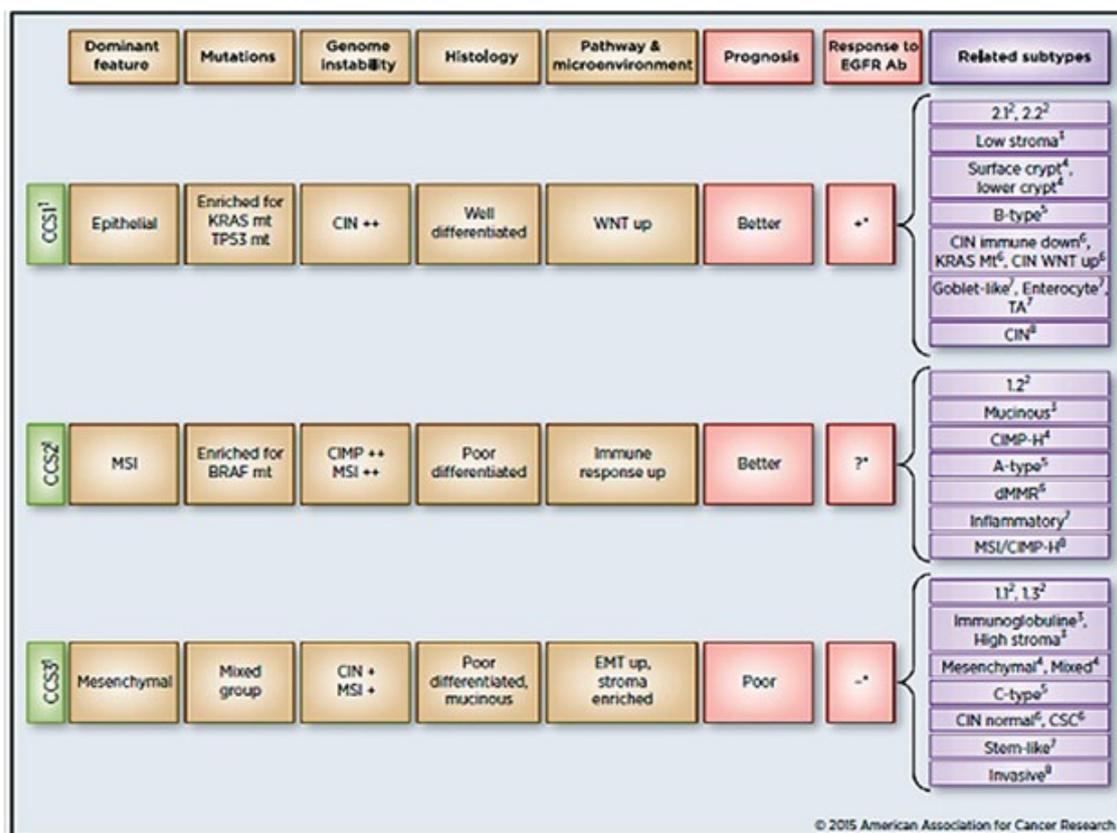


Figura 10. Resumen de la clasificación molecular del cáncer colorrectal (Linnekamp, Wang et al. 2015)

Según el grado de inestabilidad, la MSI puede ser subdividida a su vez en tres grupos: i) alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), ii) baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L), iii) y microsatélites estables (MSS) (Jass 2007). Por otro lado, en función de la metilación epigenética han sido

identificados tres epigenotipos distintos: i) de alta metilación (HME), ii) de metilación intermedia (IME) y iii) de baja metilación (LME) (Kaneda and Yagi 2011).

4.3. MELANOMA

La actual clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza aspectos morfológicos de la fase de crecimiento temprana (radial) y lugar de aparición del melanoma primario, para distinguir cuatro tipos:

- Melanoma de extensión superficial (SSM, del inglés *superficial spreading melanoma*)
- Melanoma léntigo maligno (LMM, del inglés *lentigo maligna melanoma*)
- Melanoma nodular (NM, del inglés *nodular melanoma*)
- Melanoma lentiginoso acral (ALM, del inglés *acral lentiginous melanoma*) (Bastian 2014)

Los subtipos histológicos más comunes son SSM (70% de los casos diagnosticados) y NM (20% de los casos diagnosticados). SSM, también conocido como melanoma en fase de crecimiento radial (RGP, del inglés *radial growth phase*) se caracteriza por una apariencia plana y un crecimiento horizontal lento. En contraste, NM es normalmente más grueso que SSM y se caracteriza por un crecimiento rápido. NM tiende a moverse verticalmente y penetrar en la dermis, y es entonces cuando se refiere como melanoma en fase de crecimiento vertical (VGP, del inglés *vertical growth phase*) (Poliseno, Haimovic et al. 2012).

Los melanomas asociados con un alto daño solar (LMM) comúnmente tienen mutado *NRAS* y algunas veces *KIT*, mientras que los tumores SSM, se caracterizan por tener mutado *BRAF*. La activación aberrante de la ruta MAPK está presente en más del 80% de los melanomas primarios y las mutaciones en

las proteínas de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK son mutuamente excluyentes (Scolyer, Long et al. 2011).

5. HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL: CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

5.1. DEFINICIÓN

Dentro de cada tumor individual existe una alta variabilidad (heterogeneidad intratumoral), en el cual las células del tumor tienen un rango de propiedades y una diversa expresión de marcadores. Estas células tumorales están ordenadas jerárquicamente y mantenidas por una subpoblación con propiedades funcionales de células madre, como son la capacidad de autorrenovación, lo cual les permite que al menos una célula de su progenie conserve las características de célula madre, y de diferenciación multipotente hacia todas las células cancerígenas diferenciadas que comprenden el tumor. A estas células se las ha denominado como células madre cancerígenas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*) (Reya, Morrison et al. 2001; Koch, Krause et al. 2010; Shackleton 2010; Visvader 2011; Shigdar, Li et al. 2014). Estas subpoblaciones de CSCs se encuentran en una proporción relativamente pequeña en la masa tumoral, tienen una baja tasa de proliferación, un mecanismo protector de reparación del ADN, sobreexpresan genes antiapoptóticos y presentan resistencia a drogas y toxinas, en parte, por la expresión de una gran cantidad de transportadores ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*). Además, el estado de quiescencia les permite evadir los quimioterapéuticos, protegiendo la continuidad del tumor, y las dota de la habilidad de propagar y sostener la tumorigénesis (Shigdar, Li et al. 2014).

La primera identificación de CSCs fue llevada a cabo en un estudio de leucemia aguda mieloide humana (AML, del inglés *human acute myeloid leukemia*), siendo identificadas como $CD34^+CD38^-$, un fenotipo similar al de las células madre hematopoyéticas, indicando la presencia de una jerarquía

(Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet and Dick 1997). Posteriormente, el concepto de CSC ha sido descrito en diferentes tipos tumorales.

5.2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

El término de CSCs está derivado de la habilidad de una cierta población de células para ser capaces de propagar el tumor *in vivo* después de su trasplante a un modelo animal. Una hipótesis en cuanto al origen de estas células es la transformación oncogénica de células madre somáticas (Smalley and Ashworth 2003). Sin embargo, existe otra hipótesis que indica que estas subpoblaciones de CSCs no contienen necesariamente la célula de origen inicial del tumor primario (Visvader 2011; Shigdar, Li et al. 2014). La acumulación de varios eventos oncogénicos en una célula pueden provocar la formación de un tumor (Shigdar, Li et al. 2014). Cuando el tumor se expande, los vasos sanguíneos son destruidos y sustituidos por nuevos vasos creados para que el tumor siga creciendo, pero esta vascularización se lleva a cabo de forma desorganizada e ineficiente por lo que deja regiones hipóxicas (Milane, Ganesh et al. 2011). Ello provoca la sobreexpresión del factor inducible de hipoxia (HIF, del inglés *hipoxia inducible factor*), *SNAIL* y *TWIST1*, así como la activación de las rutas de pluripotencia, la inducción de la hipometilación del ADN y el comienzo del proceso EMT, confiriendo las características biológicas necesarias para completar la mayoría de los pasos de invasión-metástasis en células epiteliales cancerosas (Shigdar, Li et al. 2014). Se ha demostrado que las células cancerígenas pueden desdiferenciarse, readquiriendo características de CSCs (Cozzio, Passegue et al. 2003; Chaffer, Brueckmann et al. 2011), proceso al que se denomina plasticidad, por lo que este puede ser el proceso por el que las células cancerígenas llegan a ser CSCs seguidas por una progresión a través de EMT y la migración a sitios secundarios (Figura 11) (Shigdar, Li et al. 2014).

Zhizhong *et al* demostraron que la inhibición de los genes *HIF-1 α* y *HIF-2 α* en CSCs de glioblastoma primario humano provocaba un descenso en la proliferación y una inducción de la apoptosis *in vitro*, así como un descenso del potencial tumorigénico *in vivo*, dando lugar a una mayor supervivencia (Li, Bao

et al. 2009). En líneas celulares de neuroblastoma se ha demostrado que en condiciones de hipoxia se produce un aumento de la expresión de *DLK1*, relacionado con características de CSCs (Kim, Lin et al. 2009) y en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC, del inglés *human head and neck squamous cell carcinoma*) induce un incremento en células con fenotipo $CD44^{high}/ESA^{low}$, característico de células con capacidad metastásica, y una mayor formación de esferas (Gammon, Biddle et al. 2013). Además, en cáncer de mama se ha demostrado que en condiciones de hipoxia se aumenta la proporción de CSCs *in vitro* e *in vivo* (Conley, Gheordunescu et al. 2012).

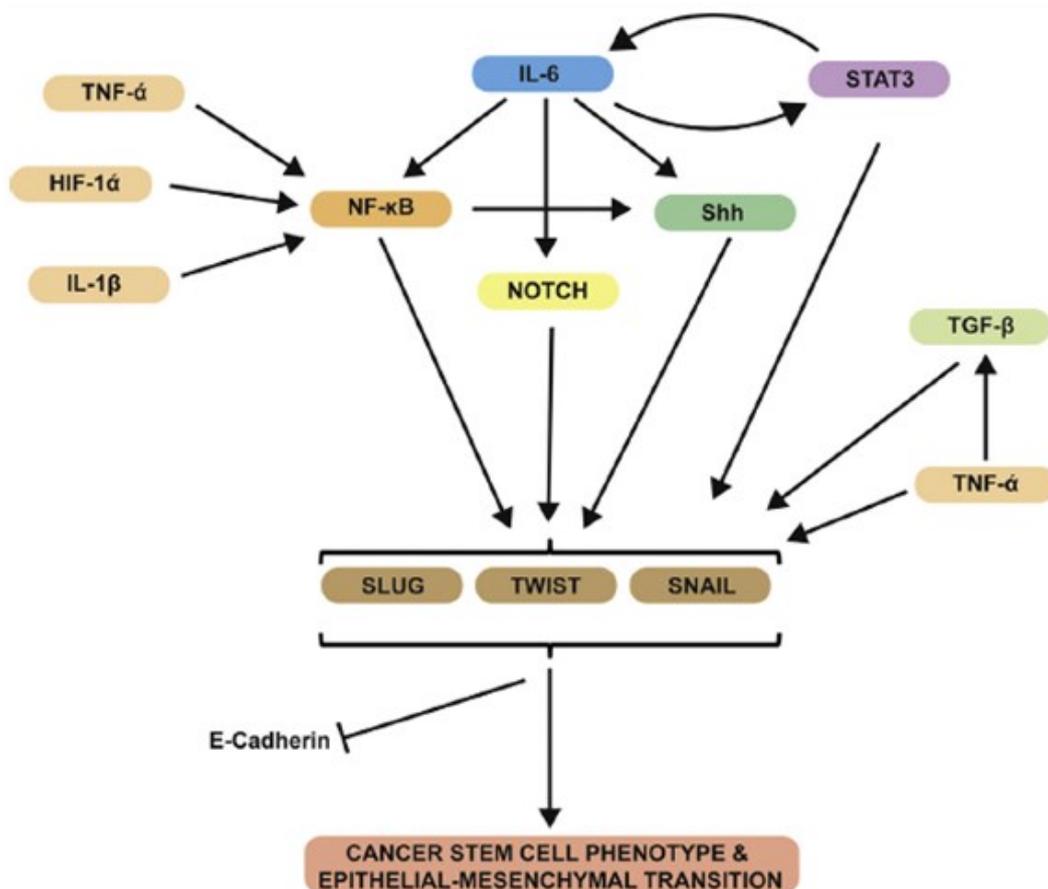


Figura 11. Rutas de señalización interrelacionadas asociadas con CSCs y EMT (Shigdar, Li et al. 2014)

5.3. AUTORRENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA DE LAS CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

La habilidad de autorrenovación y diferenciación en linajes específicos de las células madre es regulada por señales medioambientales presentes en el nicho de estas células. Estas señales incluyen las que pertenecen a las rutas de señalización Wnt, Notch, Sonic Hedgehog (SHh), SAT 3/5, y otras, que actúan individualmente o por integración con otras señales. Algunas de estas rutas están frecuentemente desreguladas en cáncer y pueden jugar un papel crucial en las células cancerígenas con propiedades de células madre (Figura 12) (Malaguarnera and Belfiore 2014).

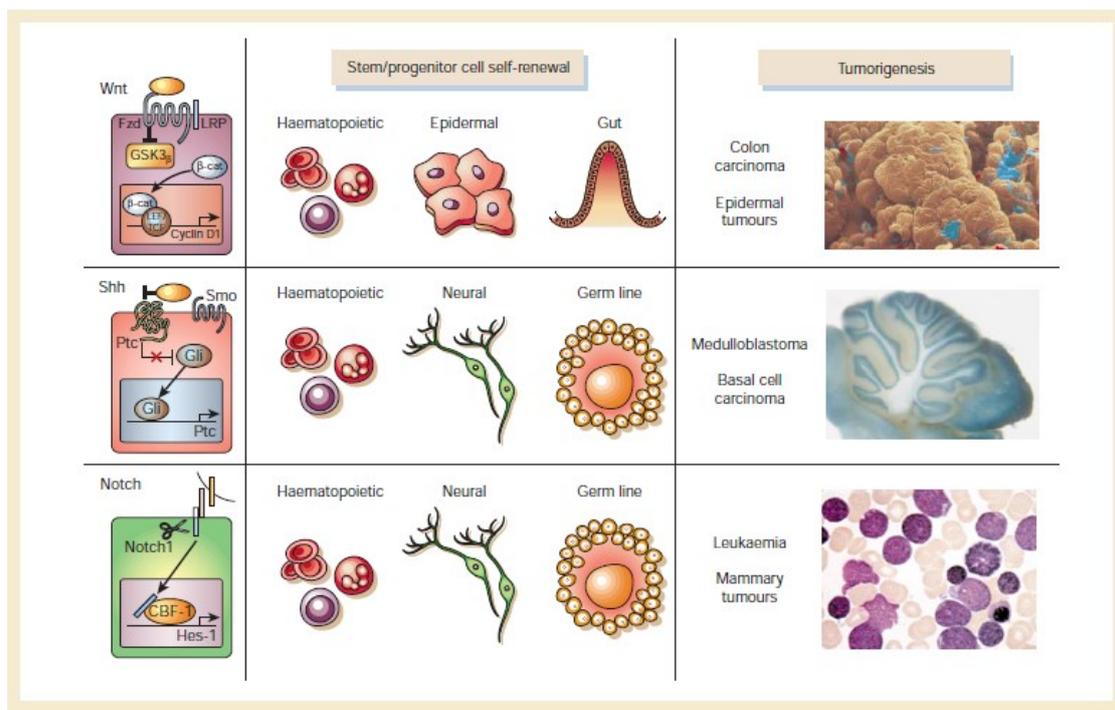


Figura 12. Expresión diferencial según el tipo de tejido de las principales rutas de pluripotencia (Reya, Morrison et al. 2001).

5.3.1. Ruta Notch

La ruta Notch está aberrantemente activada en una variedad de tumores, siendo involucrada en la biología de las CSCs, metástasis,

angiogénesis, resistencia al tratamiento, y proceso de EMT (Malaguarnera and Belfiore 2014).

El receptor de Notch es una proteína transmembrana de paso único conservada evolutivamente, que contienen un dominio extracelular (N^{EC}), un dominio transmembrana (N^{TM}) y un dominio intracelular (N^{IC}). La familia de NOTCH de mamíferos está formada por cuatro miembros (NOTCH 1-4) que son aproximadamente el 60% homólogos entre ellos. Los mamíferos expresan cinco ligandos canónicos de NOTCH: DLL-1, DLL-3, DLL-4, Jagged1 y Jagged2 (Espinoza and Miele 2013). La activación del receptor NOTCH requiere la interacción célula-célula, mediante la unión de un ligando presente en una célula colindante. Estos eventos provocan tres roturas proteolíticas consecutivas, incluyendo una rotura final por un complejo γ -secretasa, el cual produce un fragmento de NOTCH activo y estable (N^{IC}) (Malaguarnera and Belfiore 2014). La enzima γ -secretasa está formada por la presenilina, su subunidad catalítica; nicastrina, la cual mantiene la estabilidad del complejo y regula el tráfico de proteínas intracelulares; APH1, requerido para la actividad proteolítica; y PEN-2 (PSENEN), que estabiliza el complejo después de la actividad proteolítica (Capaccione and Pine 2013; Espinoza and Miele 2013). N^{IC} se transloca al núcleo y se une al complejo de proteínas de unión al ADN (RBPJk), un represor transcripcional, que cuando se le une el N^{IC} se convierte en un activador por desplazamiento del co-represor SMRT/HDAC1 del complejo RBPJk, permitiendo la transcripción de los genes diana de la ruta Notch (Figura 13) (Capaccione and Pine 2013). Esto provoca un incremento en la sobreexpresión de marcadores de células madre como OCT4, SOX2, NANOG, Lin28B, entre otros, y marcadores mesenquimales (A-SMA, fibronectina, n-cadherina, vimentina, PDGF, ZEB1, TWIST, SNAIL, SLUG), y, además, una menor expresión de marcadores endoteliales y epiteliales (ve-cadherina, TIE1, TIE2, sintasa NO endotelial, etc.) (Malaguarnera and Belfiore 2014).

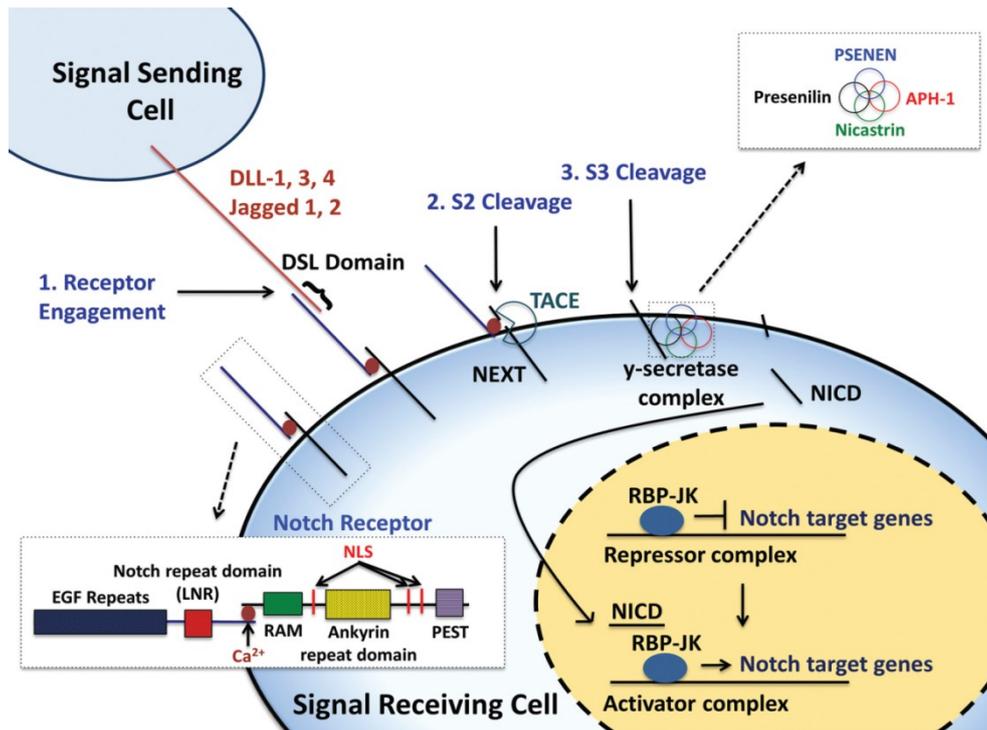


Figura 13. Imagen esquemática de la ruta Notch (Capaccione and Pine 2013)

Aunque esta ruta canónica es la responsable de la mayoría de la señalización de la ruta Notch, existe otras rutas alternativas no canónicas: independientes de RBPJk (tipo I), independiente de la rotura S3 (tipo II) o mediada por señales que activan genes dependientes de RBPJk sin rotura de NOTCH (tipo III), debidas a interacciones de NOTCH con factores de transcripción como la β -catenina, HIF-1 α , NF- κ β , y ER α (Espinoza and Miele 2013).

5.3.2. Ruta Wnt/ β -catenina

Durante la embriogénesis, la proteína WNT determina el destino celular en varias etapas del desarrollo, y su señalización actúa regulando la maduración de una variedad de sistemas incluyendo los sistemas cardiovascular, nervioso central, renal y pulmonar. En adultos la señalización de la ruta Wnt tiene un papel clave en la regulación de la autorrenovación del tejido, particularmente en las criptas intestinales, folículos pilosos y placas de crecimiento óseo. La señalización de la ruta Wnt está desregulada en una gran

variedad de tumores y ha sido asociada con CSCs, estando involucrada en el mantenimiento de su fenotipo tumorigénico (Takebe, Harris et al. 2011).

La familia de genes *WNT* codifica 19 genes de glicoproteínas ricas en cisteínas que se unen a los receptores frizzled (FZD) (Yu, Pestell et al. 2012) y a proteínas relacionadas con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP, del inglés *low-density lipo-protein receptor-related protein*) (Shigdar, Li et al. 2014). En ausencia de WNT, β -catenina es parte de un complejo multiproteico que incluye axina, APC y GSK3 β , la cual fosforila constitutivamente a β -catenina, provocando su degradación (Malaguarnera and Belfiore 2014). La unión de WNT a su receptor provoca la activación de la proteína dishevelled (DSH), inactivando GSK3 β , estabilizando así a la β -catenina (Yu, Pestell et al. 2012). β -catenina se trasloca al núcleo donde se une al factor de transcripción TCF/LEF, un activador clave de la expresión de genes diana que controlan las características de autorrenovación, activando la expresión de *OCT4* y *NANOG*, reguladores cruciales de la pluripotencia celular (Figura 14) (Malaguarnera and Belfiore 2014).

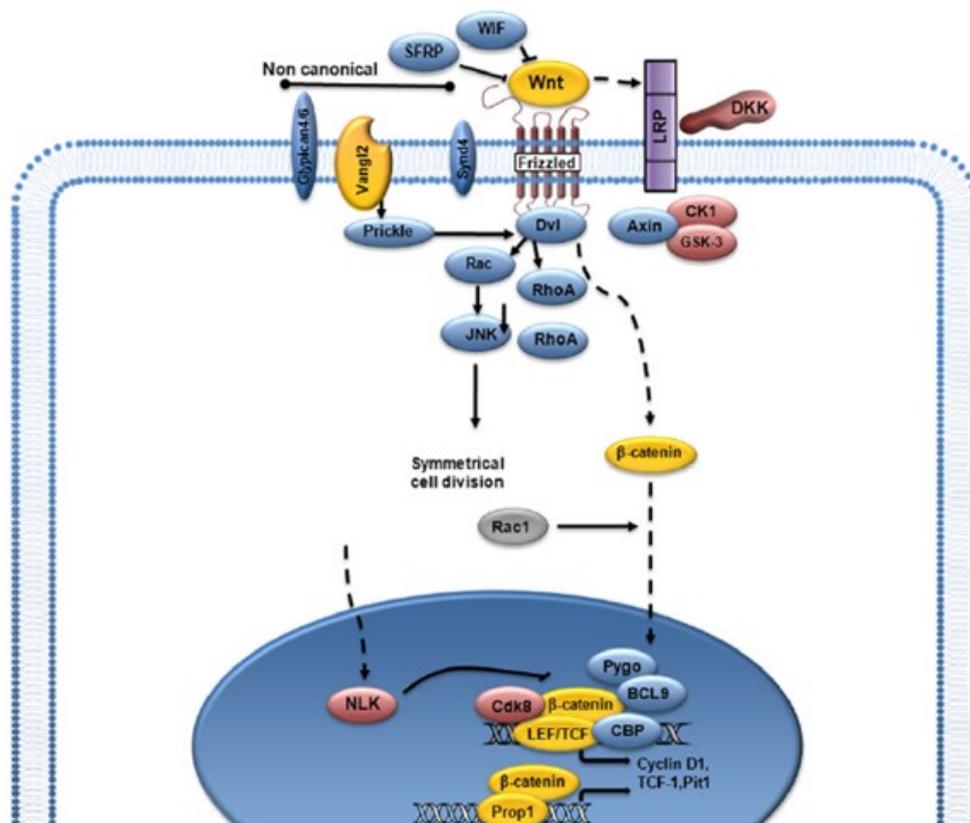


Figura 14. Imagen esquemática de la ruta Wnt (Yu, Pestell et al. 2012)

5.3.3. Ruta Hedgehog (Hh)

Durante el desarrollo embrionario, Hh controla la formación y modula la proliferación y la diferenciación de las células madre/progenitoras. En el adulto regula la homeostasis celular a través de la activación selectiva de factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de las células madre, y reparación y regeneración del tejido. La activación de la ruta canónica es iniciada por ligandos peptídicos llamados hedgehogs (Hh). En humanos existen tres tipos de estos ligandos: Sonic hedgehog (SHh), Indian hedgehog (IHh) y Desert hedgehog (DHh), de los cuales SHh es el mejor estudiado. La secreción del ligando es llevada a cabo por la proteína de membrana dispatched, para unirse a su receptor, patched (PTCH). En humanos se expresan dos homólogos de este receptor, PTCH1 y PTCH2, con similar afinidad por los ligandos Hh, pero con expresión diferencial en tejidos. PTCH funciona como un receptor inhibitorio de la ruta, bloqueando la activación de la ruta en ausencia del ligando Hh por inhibición de la proteína transmembrana smoothed (SMO). La proteína SMO activa provoca fundamentalmente el cambio en el procesamiento postraduccional de los factores de transcripción de la familia GLI (GLI1, GLI2, GLI3), suprimiendo la generación de isoformas de GLI represoras (GLI-R). La transcripción de genes diana por parte de GLI incluye GLI1, el cual es solo transcrito como un activador (GLI-A) y PTCH1 (Gonnissen, Isebaert et al. 2013). Así, la activación incontrolada de la señalización SHh a través de la pérdida de función en los reguladores negativos, como PTCH, siendo además activada por TNF- α e IL-1 β , resulta en una activación constitutiva y sobreproducción de SHh en cánceres humanos (Shigdar, Li et al. 2014). Otros genes diana incluyen reguladores del ciclo celular (ciclina D1/2, *N-MYC*), moléculas antiapoptóticas (*BCL2*), moléculas angiogénicas (*VEGF*, *ANGI-2*), reguladores de la EMT (*SNAIL*, *MMP9*), moléculas implicadas en la autorrenovación (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2*) así como efectores de otras rutas de señalización del desarrollo como WNT. Además, existe una ruta no canónica independiente de SMO que parece tener relación con rutas oncogénicas como MAPK, PI3K, NF- κ B y TGF- β , así como con moléculas supresoras de tumores como TP53 y PTEN (Figura 15) (Gonnissen, Isebaert et al. 2013).

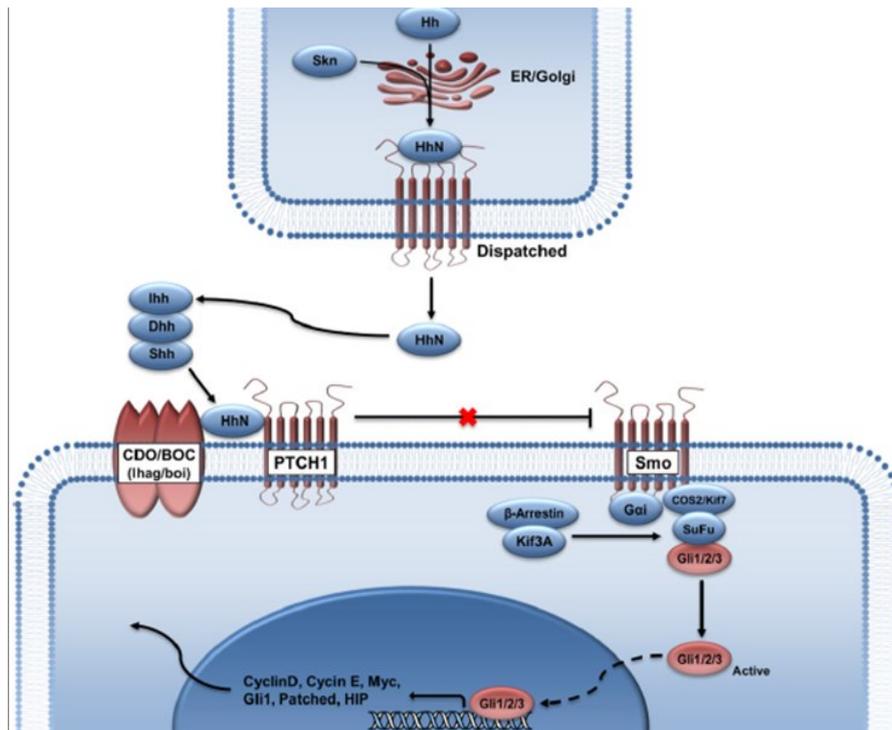


Figura 15. Imagen esquemática de la ruta Hedgehog (Yu, Pestell et al. 2012).

5.4. QUIMIO Y RADIORRESISTENCIA

Otra característica de las CSCs es la multirresistencia a drogas (MDR, del inglés *multidrug resistance*). Las presiones selectivas del microambiente contribuyen al desarrollo de MDR incluyendo una vasculatura anormal, hipoxia, descenso del pH, incremento de la presión del fluido intersticial, y alteraciones en la expresión de supresores de tumores y oncogenes. Bajo condiciones de hipoxia se activa el factor de transcripción HIF, el cual tiene genes diana involucrados en la invasión, proliferación, metabolismo y resistencia a drogas. Uno de los mecanismos más estudiados de resistencia a drogas es el mediado por la sobreexpresión de transportadores ABC (Milane, Ganesh et al. 2011). Estos transportadores constituyen una familia de proteínas codificada por 48 genes diferentes, caracterizadas por la presencia de múltiples dominios transmembrana que forman un canal a través del cual los compuestos farmacológicos son expulsados usando energía derivada de la hidrólisis de ATP, habilidad que les confiere a las CSCs resistencia a fármacos. Algunos de estos transportadores contribuyen a la protección frente a xenobióticos, y son normalmente expresados como barreras farmacológicas en la membrana del

borde en cepillo de las células intestinales o en el epitelio que contribuye a la barrera hematoencefálica (Mallini, Lennard et al. 2014). Entre las proteínas ABC más estudiadas se encuentran la P-glicoproteína (P-gp, MDR1, ABCB1) (Munoz, Rodriguez-Cruz et al. 2014; Celestino, Levy et al. 2015), la proteína de resistencia a multidrogas-1 (MRP-1, ABCC1) (Celestino, Levy et al. 2015) y la proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP, ABCG2) (Munoz, Rodriguez-Cruz et al. 2014).

Por otra parte la radiorresistencia de las CSCs se asocia a que estas tienen niveles más bajos de ROS que su progenie. Además, las CSCs tienen mayores niveles de sistemas de defensa antioxidante y desarrollan un menor daño en el ADN después de la radiación (Liu, Chen et al. 2011).

5.5. METÁSTASIS

La metástasis es un proceso formado por varias etapas, que comprende un progresivo crecimiento, vascularización, invasión, desprendimiento, embolización, supervivencia en la circulación, arresto, extravasación, evasión del sistema inmunológico y crecimiento progresivo (Liu, Chen et al. 2011).

En los cánceres epiteliales, la metástasis ocurre por un proceso de EMT. Durante este proceso las células epiteliales pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades mesenquimales por reordenamientos en el citoesqueleto y alteraciones en la adhesión, estructura celular y morfología. Como resultado, estas células son capaces de migrar (Britton, Kirby et al. 2011; Mallini, Lennard et al. 2014).

El proceso de EMT tiene un importante papel durante la embriogénesis y es altamente conservado durante la vida adulta para garantizar la plasticidad, reparación y mantenimiento del tejido. Una característica clave del proceso EMT es el descenso en la expresión de e-cadherina, una molécula de adhesión celular transmembrana importante en el mantenimiento de la polaridad celular epitelial (Malaguarnera and Belfiore 2014), así como de ZO-1, ocludina, claudina-1 y claudina-7, perdiendo los contactos célula-célula y despegándose unas de otras (Cui, Shi et al. 2013), produciéndose además un incremento en

la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina y n-cadherina. Estos cambios dirigen la transformación de células con características epiteliales, adhesivas y no móviles hacia células con características de células madre móviles (Malaguarnera and Belfiore 2014).

La e-cadherina puede ser transcripcionalmente reprimida por una serie de factores de transcripción como ZEB (ZEB1 y ZEB2), SNAIL, SLUG y TWIST. Esos factores de transcripción están aguas abajo de rutas de señalización que incluyen, TGF- β , Wnt/ β -catenina, Notch, FGF, STAT-3, EGF y NF- $\kappa\beta$. La pérdida de expresión de e-cadherina conduce a la liberación de β -catenina que se transloca al núcleo y modula transcripcionalmente varios genes como *CCDN1*, *CD44*, *MYC* y *VEGF*, y promueve el desarrollo y progresión del cáncer (Cui, Shi et al. 2013).

Las interacciones entre las células tumorales y el estroma tienen una gran importancia tanto en la iniciación de la enfermedad como en su progresión. Los tumores sólidos dan lugar a una respuesta inflamatoria durante la progresión cancerígena. La respuesta inflamatoria modifica el ambiente del tumor, con una afluencia de células inmunes que se unen a la mezcla heterogénea de células que rodea el tumor en el estroma (fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales). Las citoquinas secretadas por células inmunes asociadas al tumor activan las rutas necesarias para facilitar el progreso de las CSCs a través de la EMT y la migración a sitios distantes (Shigdar, Li et al. 2014). Numerosos estudios han demostrado el papel de los macrófagos asociados al tumor (TAMs, del inglés *tumor-associated macrophages*) en la invasión tumoral a través de una señalización paracrina que involucra al factor estimulante de colonias-1 (CSF-1, del inglés *colony-stimulating factor 1*) derivado del tumor y EGF derivado de macrófagos. TAMs son la principal fuente de proteasas, como catepsinas, que soportan la progresión tumoral y la resistencia terapéutica en múltiples tipos cancerígenos. Además, en el microambiente tumoral, los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, del inglés *cancer-associated fibroblasts*) están presentes en un número aberrantemente grande y se distinguen de los fibroblastos normales, confiriendo un fenotipo con propiedades mesenquimales e intensificando la metástasis, mientras que los fibroblastos normales promueven un fenotipo

epitelial y suprimen la metástasis. Una vez que los CAFs se acumulan en la matriz extracelular se activan por factores de crecimiento y citoquinas, como TGF- β , MCP1, PDGF, FGF y proteasas, que están presentes en el medio circundante. Después de la activación, CAFs dan lugar a una mayor cantidad de factores de crecimiento que favorecen la tumorigénesis, incluyendo VEGF, el cual induce la permeabilidad vascular y la angiogénesis. CAFs además producen factores pro-inflamatorios que activan la señalización de NF- κ B que promueve la tumorigénesis (Figura 16) (Quail and Joyce 2013).

Una vez que estas células metastatizan en el órgano diana, pueden llevar a cabo un proceso de transición mesenquimo-epitelial (MET, del inglés *mesenchymal-epithelial transition*), proliferar y establecer nuevos tumores que completen el proceso metastásico (Britton, Kirby et al. 2011).

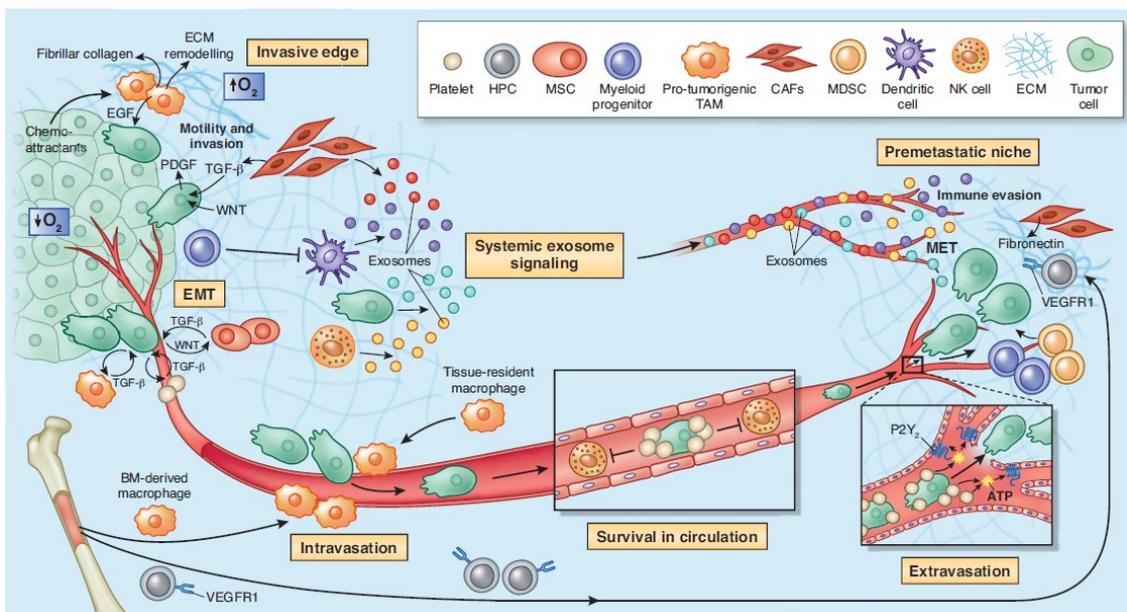


Figura 16. El microambiente soporta la diseminación metastásica y la colonización de un nicho secundario (Quail and Joyce 2013)

5.6. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

CSCs se pueden identificar y aislar en base a diferentes características que permiten cuatro metodologías principales: aislamiento por citometría de flujo en base a marcadores de superficie celular específicos de CSCs,

detección del fenotipo *Side Population* (SP) mediante la exclusión del colorante Hoechst 33342, determinación de la habilidad de formar esferas en flotación en medio libre de suero y la capacidad de expresar altos niveles de actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH). Ninguno de estos métodos es exclusivamente utilizado para el aislamiento de CSCs por lo que se deben utilizar de forma combinada. Un requisito imprescindible para la identificación de CSCs es su habilidad para crecer y formar tumores trasplantados de forma seriada en hospedadores inmunodeficientes, restaurando el tumor original, ya que hipotéticamente, una única célula debe ser capaz de generar un tumor. En otras palabras, las CSCs regeneran los tumores con una frecuencia mucho más alta y con un menor número de células que el resto de células del tumor (Tirino, Desiderio et al. 2013).

5.6.1. Expresión diferencial de marcadores de superficie

Esta subpoblación de CSCs muestran marcadores de superficie específicos que no aparecen en las células más diferenciadas. Entre los marcadores relacionados habitualmente con el fenotipo de CSC para un gran número de tipos tumorales se encuentran se encuentran CD44 (Mani, Guo et al. 2008; Azzam, Zhao et al. 2013; Ni, Wu et al. 2015), CD133 (Zhang, Xia et al. 2012; Ress, Stiegelbauer et al. 2014; Ni, Wu et al. 2015), CD20 (Magnoni, Giudice et al. 2014), CD326 (ESA o EpCAM) (Dalerba, Cho et al. 2007), ABCB5 (Schatton, Murphy et al. 2008) y CXCR4 (Zhang, Xia et al. 2012), entre otros.

Uno de los marcadores superficiales más comúnmente utilizados es CD133 (Prominin 1 o AC133), una glicoproteína transmembrana expresada en poblaciones de células madre normales y cancerígenas, cuya función tiene relación con la pluripotencia y/o multipotencia (Tirino, Desiderio et al. 2013). CD44 es otra glicoproteína transmembrana, presente en varias isoformas (Orian-Rousseau 2010), que participa en las uniones celulares, en la adhesión a la matriz extracelular y en la migración celular. CD44 se une a ácido hialurónico así como a colágeno, fibronectina, laminina y condroitín sulfato, componentes importantes de la matriz extracelular. Algunos tipos de células

cancerígenas, así como sus células metastásicas, expresan altos niveles de CD44 y/o variantes de CD44. Así, el bloqueo de las interacciones CD44-ligando inhiben el crecimiento local del tumor y su metástasis (Lorico and Rappa 2011). CD326, también llamada Epcam o ESA, es una glicoproteína transmembrana frecuentemente sobreexpresada en carcinomas, células progenitoras de ciertos tejidos y células madre adultas y embrionarias, la cual está involucrada en las adhesiones intercelulares, proliferación, mantenimiento del estado de pluripotencia, regulación de la diferenciación, migración e invasión (Dolle, Theise et al. 2015).

Estos marcadores son habitualmente utilizados conjuntamente para una mejor caracterización de CSCs. Las CSCs de mama (BCSCs, del inglés *breast cancer stem cells*), fueron identificadas por primera vez en 2003 por Al-Hajj *et al*, y están caracterizadas por expresar CD44 pero no CD24 en la membrana citoplasmática, siendo capaces de formar tumores *in vivo* a partir de un pequeño número de células (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Aunque estos son los marcadores superficiales más comúnmente utilizado para aislar y/o identificar BSCSs, otros marcadores como CD133 (Lorico and Rappa 2011) y CD49 (Hermann, Bhaskar et al. 2010) han sido también utilizados. Para CSCs de colon una combinación de marcadores frecuentemente utilizados son la expresión de CD44, CD133 y/o CD326 (Dalerba, Dylla et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007; O'Brien, Kreso et al. 2009; Ni, Wu et al. 2015), aunque además se han utilizado otros como CD44⁺/CD24⁺ (Ni, Wu et al. 2015) y LGR5 (Takahashi, Ishii et al. 2011; Ying, Tsujii et al. 2015). Respecto a CSCs de melanoma, es común para su identificación y/o aislamiento la utilización de ABCB5, CD20, CD133 (Fang, Nguyen et al. 2005; Monzani, Facchetti et al. 2007; Schatton, Murphy et al. 2008; Magnoni, Giudice et al. 2014) y CD271, aunque respecto a este último marcador no existe consenso ya que su presencia (Boiko, Razorenova et al. 2010; Redmer, Welte et al. 2014) y ausencia (Held, Curley et al. 2010) ha sido relacionada con un mayor potencial tumorigénico.

5.6.2. Actividad aldehído deshidrogenasa

La familia de las enzimas ALDHs, formada por 11 familias en humanos, interviene en la síntesis de intermediarios aldehído como el ácido retinoico, el folato y la betaina. La habilidad de los miembros de la familia de las ALDHs para metabolizar reactivos aldehídos representa un mecanismo citoprotector e interviene en procesos de modulación de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia, especialmente a través de la síntesis de ácido retinoico (Jackson, Brocker et al. 2011). Se ha demostrado que la isoforma ALDH1 se expresa diferencialmente tanto en células madre como en CSCs de múltiples cánceres, siendo utilizada comúnmente su actividad para caracterizar y aislar CSCs (Pearce, Taussig et al. 2005; Ginestier, Hur et al. 2007; Azzam, Zhao et al. 2013; Xiong, Yu et al. 2015).

5.6.3. Side Population (SP)

Una subpoblación de las CSCs es la SP. El aislamiento de la subpoblación SP se basa en la capacidad que tienen determinadas células para expulsar colorantes tales como el Hoechst 33342. Esta capacidad de expulsión se debe fundamentalmente a los altos niveles de expresión de miembros de la familia de transportadores ABC, que confieren la habilidad para expulsar tóxicos como los fármacos, y este colorante en concreto. Esta habilidad permite su aislamiento por citometría de flujo. Dicha SP está formada por células con un relativo bajo grado de diferenciación y una alta capacidad de autorrenovación (Mallini, Lennard et al. 2014).

6. MICRORNAS Y CÁNCER

6.1. DEFINICIÓN, BIOGÉNESIS Y ACCIÓN

Los microARNs (miRNAs o miRs) son ARNs cortos (20- a 24-nucleótidos), monocatenarios, no codificantes que regulan la expresión génica

a nivel postranscripcional (Winter, Jung et al. 2009; Olive, Li et al. 2013; Garofalo and Croce 2015).

La transcripción de los miRs que da lugar al transcrito primario (pri-miRNA) es llevada a cabo por la ARN polimerasa II y III (Winter, Jung et al. 2009), aunque menos frecuentemente por esta última (Olive, Li et al. 2013; Pencheva and Tavazoie 2013), transcribiéndose más del 30% de los miRs como *clusters* policistrónicos de miRs (2013, Olive). Aunque la mayoría de los miRs humanos se encuentran en las regiones intergénicas o en los intrones, también se han descrito miRs en los exones (Ul-Hussain 2012).

Las deaminasas de adenosina que actúan sobre ARN (ADARs, del inglés *adenosine deaminases acting on RNA*) editan los transcritos primarios modificando adenosina (A) en inosina (I). Debido a que las propiedades de emparejamiento de bases son similares a las de guanosina (G), estos cambios pueden influir en la habilidad para reconocer su diana (Winter, Jung et al. 2009).

Estos pri-miRNAs largos, con estructuras en horquilla, son procesados a través de una serie de roturas sucesivas (Winter, Jung et al. 2009; Pencheva and Tavazoie 2013; Garofalo and Croce 2015). La proteína DGCR8 reconoce y se une a las estructuras en horquilla de la doble cadena presentes en el pri-miRNA. Esta interacción permite a la ribonucleasa DROSHA, formar un complejo con DGCR8 y romper el pri-miRNA en la horquilla de unión, dando lugar a un producto de unos 70-100 nucleótidos conocido como pre-miRNA (Gregory, Yan et al. 2004; Winter, Jung et al. 2009; Pencheva and Tavazoie 2013; Garofalo and Croce 2015). El pre-miRNA es exportado al citoplasma por la exportina 5 (EXP5) y RAN-GTP (Bohnsack, Czapinski et al. 2004; Winter, Jung et al. 2009; Pencheva and Tavazoie 2013; Garofalo and Croce 2015) y procesado por otra RNasa (DICER), dando lugar a un ARN de doble cadena de 19-24 nucleótidos (Garofalo and Croce 2015). Estos miRs maduros de doble cadena se incorporan a un complejo llamado complejo de silenciamiento de ARN inducido (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*), cuyo núcleo efector clave es un miembro de la familia de proteínas argonauta (AGO), donde una cadena del miR es preferencialmente incorporada al complejo, mientras

que la cadena complementaria es normalmente liberada y degradada (Garofalo and Croce 2015). Esta proteína interactúa directamente con miRs maduros monocatenarios y usa estos como guías para reconocer mRNAs que contienen secuencias complementarias o parcialmente complementarias al miR (Garofalo and Croce 2015), mayoritariamente en las regiones 3' no codificantes del mRNA, aunque también se han descrito interacciones con secuencias codificantes, dando lugar al reclutamiento de proteínas silenciadoras que llevan a cabo la deadenilación y descenso y/o represión traduccional (Figura 17) (Pencheva and Tavazoie 2013). Debido al pequeño tamaño y el emparejamiento imperfecto de bases con las dianas, los miRs tienen la capacidad de regular varias dianas (Olive, Li et al. 2013).

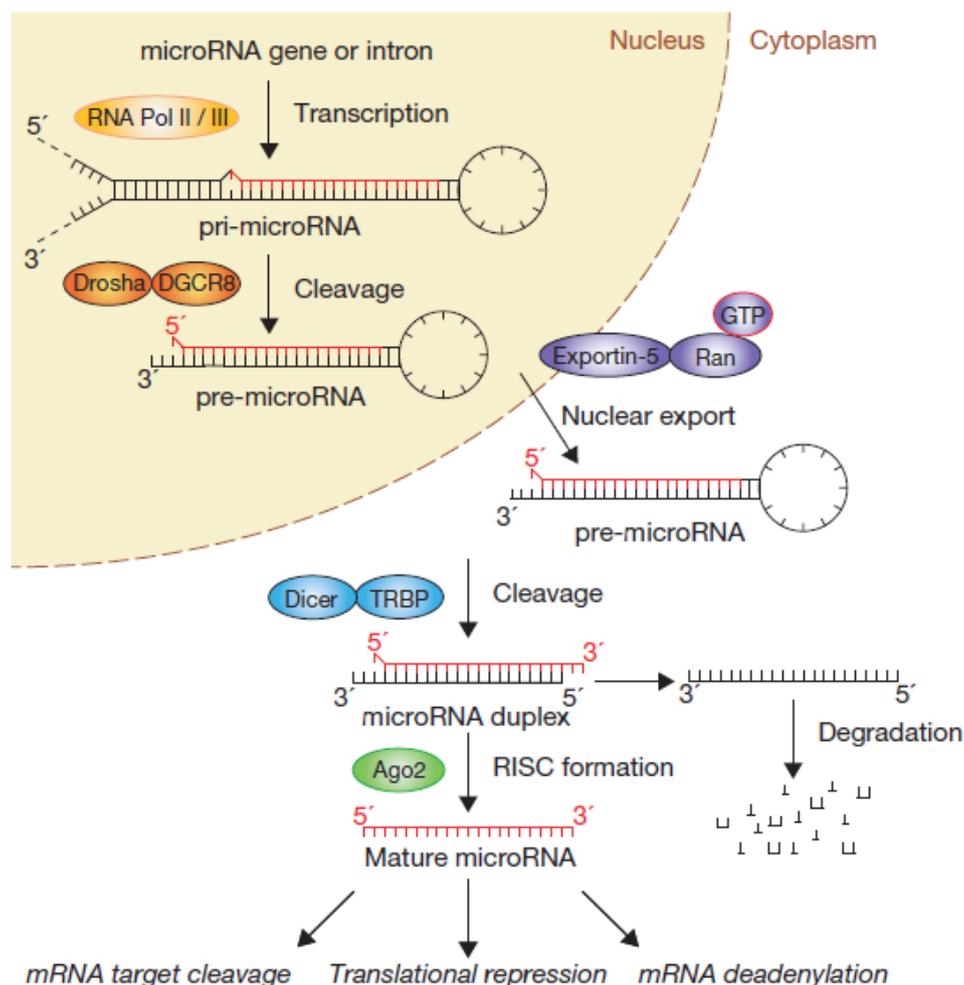


Figura 17. Ruta canónica de procesamiento de microRNAs (Winter, Jung et al. 2009).

6.2. MICRORNAs, CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA.

En humanos se han identificado casi 2000 miRs, estando implicados en varios eventos celulares como respuesta inmune, desarrollo y diferenciación celular, organogénesis, control del crecimiento celular y apoptosis. De acuerdo con varias publicaciones, estos miRs están involucrados en la patogénesis de varias enfermedades, incluido el cáncer (Shiyyama, Fukushima et al. 2013), mostrando funciones como oncogenes o genes supresores de tumores durante la carcinogénesis (Liu, Clouthier et al. 2012; Shiyyama, Fukushima et al. 2013).

Lee *et al* describieron por primera vez en *Caenorhabditis elegans* el papel de los miRs en la regulación de las células madre, apareciendo y aumentándose la expresión de Lin-4 durante el desarrollo del embrión (Lee, Feinbaum et al. 1993), al igual que Let-7 (Reinhart, Slack et al. 2000).

Las células madre humanas están enriquecidas en *clusters* de miRs que expresan 'AAGUGC' y 'AAAGUG', entre los que se incluyen los miembros del *cluster* miR-302-367, el más abundante, y de los *clusters* miR-290-295, miR-17-92 y miR-106b-25. La función de estos cuatro *clusters* es la regulación de la pluripotencia de un modo opuesto al realizado por la familia de miRs Let-7. La familia Let-7 se expresa en tejidos diferenciados, pero su maduración es bloqueada en células madre embrionarias por LIN28, que se une a los precursores de Let-7 previniendo su procesamiento. Debido a sus papeles en el control de la diferenciación, proliferación y supervivencia, estos miembros de los *clusters* miR-290-295, miR-302-367, miR-17-92 y miR-106b-25 están frecuentemente asociados con diferentes enfermedades en humanos (Tabla 2) (Vidigal and Ventura 2012).

Al igual que en células madre normales, se ha demostrado que los miRs regulan el fenotipo de CSCs y participan en múltiples rutas de señalización, desarrollando un importante papel en el desarrollo y progresión tumoral. El *cluster* miR 17-92, también conocido como oncomir-1, es un potente oncomiR cuya expresión se ha encontrado altamente elevada en múltiples tipos tumorales, entre los que se encuentran cáncer de pulmón, hígado y colon. La

sobreexpresión de este *cluster* en células tumorales favorece la proliferación celular, la evasión de la apoptosis, promueve la angiogénesis, bloquea la diferenciación y promueve la metástasis (Olive, Li et al. 2013).

Tabla 2. Clusters de miRs característicos de hESCs (Vidigal and Ventura 2012)

Gene	Mature miRNAs	Mature Sequence	KO Phenotype	Know Regulators	Chromosomal location
miR-290~295	miR-290 miR-291a miR-292 miR-291b miR-293 miR-294 miR-295	AAAGUGC AAAGUGC AAAGUGC AAAGUGC AGUGC AAAGUGC AAAGUGC	Embryonic lethal with incomplete penetrance. Defects in early embryonic patterning and PGC migration, resulting in infertility in surviving females	Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3	chromosome 7
miR-17~92	miR-17 miR-18a miR-19a miR-20a miR-19b-1 miR-92a-1	CAAAGUC UAGGUC UGUGCAA UAAAGUC UGUGCAA UAUUGCAC	KO animals die perinatally displaying lung hypoplasia, cardiac defects, block in B cell differentiation and skeletal development	c-Myc, Myc-N, BMP/Smad, E2F	chromosome 14
miR-302~367	miR-302b miR-302c miR-302a miR-302d miR-367	UAGGUC AAGGUC UAGGUC UAGGUC AAUUGCAC	n.a.	Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3, Gata6	intron 8 of <i>Larp7</i> ; chromosome 3
miR-106b~25	miR-106b miR-93 miR-25	UAAAGUC CAAAGUC CAUUGCAC	Normal. Cooperates with miR-17~92 cluster during development; double knockouts die before E15.5 with agravated phenotypes	E2F	intron 13 of <i>Mem7</i> ; chromosome 5

En CSCs de HNSCC se ha demostrado que el miR-302 es controlado aguas arriba por un promotor que contiene sitios de unión para OCT4-SOX2-NANOG, y la estimulación de la expresión de miR-302 es dependiente de estos tres factores (Bourguignon, Wong et al. 2012).

Además de estos, se han descrito numerosos miRs expresados diferencialmente en CSCs de diferentes tipos tumorales, entre los que se encuentran miembros de la familia de miR-181 (Ji, Yamashita et al. 2009; Liu, Zhou et al. 2014), miR-21 (Yu, Pestell et al. 2012; Kang 2013), miR-150 (Zhang, Luo et al. 2012), miR-191 (Xu, Ji et al. 2014) y miR-22 (Song, Ito et al. 2013), entre otros.

En sentido opuesto, miR-34 es uno de los miRs supresores de tumores directamente controlado por TP53 (Kasinski and Slack 2012). Este miR se encuentra hipermetilado en diferentes tipos tumorales, entre los que se encuentran los cánceres gástrico, de mama, de ovario, renal, pancreático, melanoma, colorrectal, entre otros, por lo que está ausente o con baja expresión, aun cuando TP53 no está mutado en el tumor (Maroof, Salajegheh

et al. 2014). Este miR tiene una importante habilidad en la inhibición del fenotipo de CSC (Liu, Kelnar et al. 2011; Yu, Jiao et al. 2012; Maroof, Salajegheh et al. 2014), debido al efecto inhibitorio que tiene sobre genes de pluripotencia como *NANOG*, *SOX2* (Maroof, Salajegheh et al. 2014), *MYC* (Kasinski and Slack 2012) y genes de EMT y metástasis (Maroof, Salajegheh et al. 2014). Otros miRs con funciones similares son miR-134, miR-296, miR-200c, miR-203, miR-183 y Let-7, entre otros. (Yu, Pestell et al. 2012).

Además, el proceso de EMT y MET es, en parte, regulado por una red de miRs entre los que se encuentran miR-9, miR-100, miR-221, miR-155, miR-200, miR-205, miR-93 en BCSCs (Figura 18) (Liu, Clouthier et al. 2012), miR-199a (Yin, Chen et al. 2010) y miR-451 (Bitarte, Bandres et al. 2011).

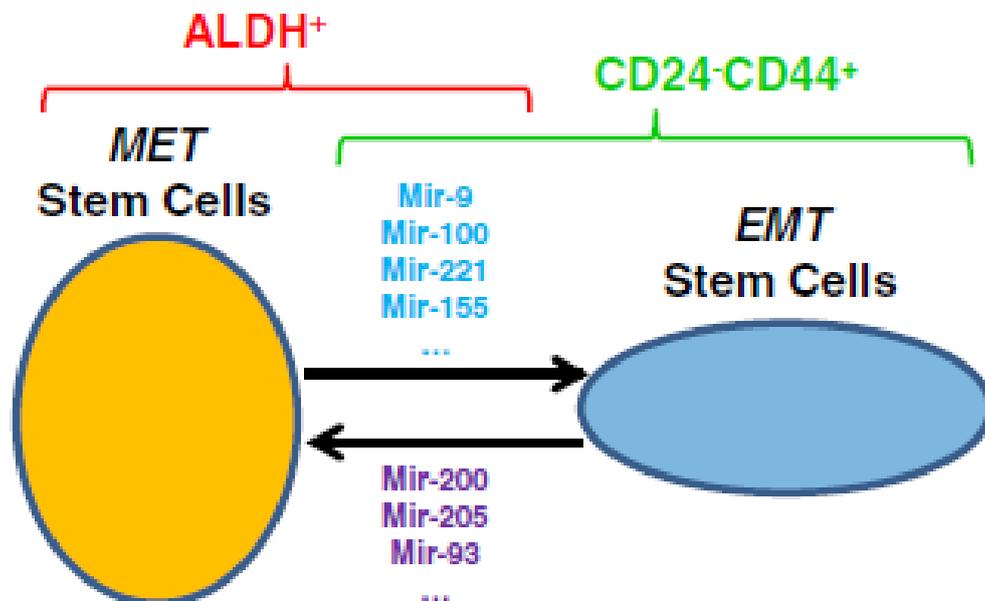


Figura 18. Regulación de los procesos de EMT y MET en BCSCs por miRs (Liu, Clouthier et al. 2012)

7. TRATAMIENTO

7.1. CÁNCER DE MAMA

El tratamiento quirúrgico del cáncer de mama puede llevarse a cabo mediante cirugía conservadora de mama o mastectomía (DeSantis, Lin et al. 2014). Por su parte, el tratamiento con quimioterapia puede realizarse antes (neoadyuvante) o después (adyuvante) de la cirugía. La quimioterapia

neoadyuvante es considerada conveniente en pacientes con menos de 40 años, con un tamaño del tumor menor a 2 cm, histología ductal invasiva, bajo grado de diferenciación, altos niveles de Ki67, bajos niveles o ausencia de ER, subtipos basales o HER2⁺ (Schmidt 2014).

Las recomendaciones en el tratamiento quimioterapéutico en estadios tempranos según el subtipo, se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Terapia de elección según el subtipo tumoral (Goldhirsch, Winer et al. 2013).

SUBTIPO TUMORAL	TIPO DE TERAPIA
Luminal A	Terapia endocrina. Citotóxicos en pacientes seleccionados.
Luminal B (HER2 negativo)	Terapia endocrina. Citotóxicos en la mayoría de los pacientes.
Luminal B (HER2 positivo)	Citotóxicos+anti-HER2+endocrina
HER2 positivo (no luminal)	Citotóxicos + anti-HER2
Triple negativo	Citotóxicos

La terapia endocrina se utiliza en el caso de que los tumores sean dependientes de hormonas, siendo los quimioterapéuticos utilizados en estadios tempranos el tamoxifeno e inhibidores de aromatasa (este último solo en mujeres posmenopáusicas) (Goldhirsch, Winer et al. 2013). En tumores metastásicos en mujeres premenopáusicas la primera línea de terapia endocrina es el tamoxifeno y supresión de la función ovárica por un agonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH). El acetato de medroxiprogesterona es recomendado como segunda o tercera línea de terapia debido a sus efectos adversos. En mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama metastásico, la primera línea de terapia endocrina son el tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant e inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano) (Iwase and Yamamoto 2015).

En cuanto a los quimioterapéuticos citotóxicos utilizados como terapia adyuvante con mayor frecuencia se encuentran las antraciclinas, como la

doxorubicina o epirubicina, y los taxanos, como el paclitaxel o docetaxel (Schmidt 2014).

7.2. CÁNCER COLORRECTAL

El tratamiento varía según la localización del tumor y el estadio en el momento de diagnóstico. De este modo, la cirugía para eliminar el tumor es el tratamiento más común en estadios I y II. Para los pacientes con cáncer de colon en estadio III, y algunos con estadios II, la cirugía es seguida por quimioterapia, disminuyendo el riesgo de recurrencia. En pacientes de colon avanzado la quimioterapia es habitualmente el tratamiento principal (DeSantis, Lin et al. 2014).

La evolución de la quimioterapia para el CCR comenzó con el desarrollo en 1957 del 5-fluorouracilo (5-FU) (Figura 19) (Heidelberger, Chaudhuri et al. 1957).

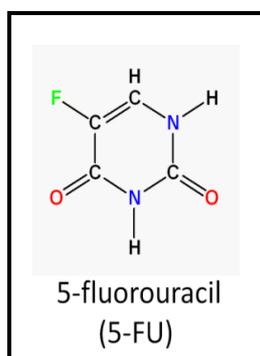


Figura 19. Estructura química del 5-fluorouracilo (Alvarez, Marchal et al. 2012).

Charles Heidelberger *et al* observaron que los tejidos tumorales usaban preferencialmente para la biosíntesis de sus ácidos nucleicos uracilo, por lo que un análogo del fluorouracilo podría inhibir la división de la célula tumoral mediante el bloqueo de la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofostato (timidilato). La principal ruta de activación del 5-FU resulta de la formación de fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), un potente inhibidor de la timidilato sintasa. Desde entonces la quimioterapia del

CCR ha avanzado principalmente mediante la combinación del 5-FU con otros quimioterapéuticos como leucovorin (5-formil tetrahidrofolato [THF]), oxaliplatino (agente que contiene platino), irinotecan (inhibidor de la topoisomerasa I) y capecitabina (Figura 20) (Gustavsson, Carlsson et al. 2015).

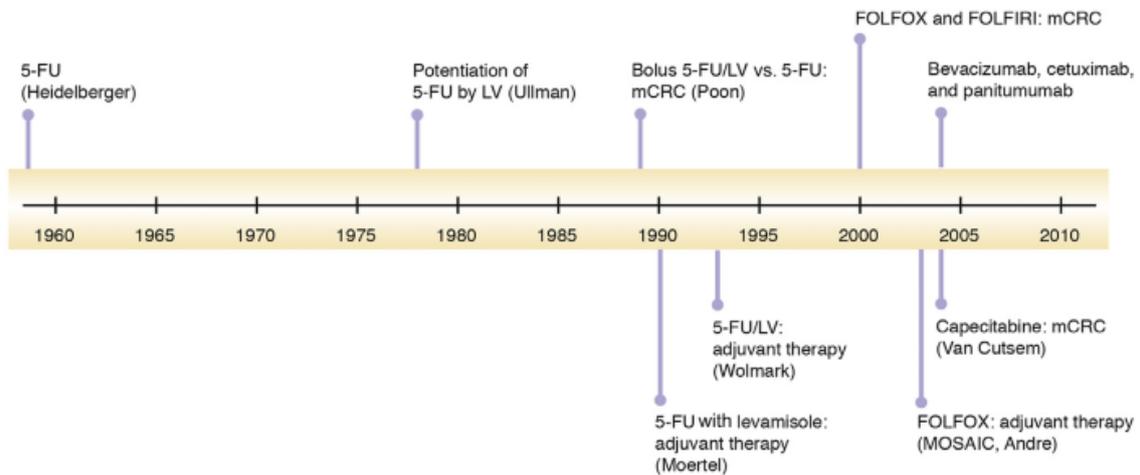


Figura 20. Evolución en el uso de nuevos quimioterapéuticos en pacientes con CCR. 5-FU = 5-Fluorouracil; FOLFIRI = Infusional 5-FU/LV con irinotecan; FOLFOX = 5-FU/LV con oxaliplatino; LV = Leucovorina; mCRC = cáncer colorrectal metastásico (Gustavsson, Carlsson et al. 2015).

En pacientes con tumores en estadio III los regímenes quimioterapéuticos estándar de elección son FOLFOX (5-FU/leucovorin and oxaliplatino) o capecitabina más oxaliplatino (XELOX). Sin embargo, para los pacientes con más de 70 años, una terapia basada únicamente en 5-FU ha mostrado beneficios. En pacientes en estadio IV, el tratamiento combinado de 5-FU y leucovorina incrementa la eficacia del 5-FU. La adición de irinotecan (5-FU, leucovorina, irinotecan [FOLFIRI]) y oxaliplatino (FOLFOX) aumentan la tasa de supervivencia. En pacientes jóvenes, en un buen estado, también puede ser utilizada la combinación de 5-FU, irinotecan y oxaliplatino (FOLFOXIRI), la cual ha mostrado mayor eficacia que FOLFIRI. Además, la utilización de anticuerpos para VEGF, bevacizumab, y para EGFR, cetuximab y panitumumab, aumentan la tasa de supervivencia. (Stintzing 2014).

7.3. MELANOMA

La cirugía es el primer tratamiento para la mayoría de los melanomas. La radiación es especialmente utilizada en pacientes con melanoma metastásico, junto quimioterapia o inmunoterapia (DeSantis, Lin et al. 2014). En pacientes con melanomas en estadio III puede utilizarse inmunoterapia con interferón. Las terapias utilizadas comúnmente para el melanoma metastásico pueden ser clasificadas en tres grupos: quimioterapia citotóxica, terapia molecular dirigida e inmunoterapia. Los primeros dos grupos reflejan drogas que van directamente frente a la célula cancerígena, normalmente mediante la interferencia con procesos celulares relevantes para la proliferación de las mismas. La inmunoterapia, por otro lado, ejerce su efecto indirectamente mediante la modulación de la respuesta inmune frente a las células cancerígenas. Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos usados en melanoma metastásico incluyen agentes alquilantes (dacarbazina, temozolomida, nitrosoureas), toxinas microtubulares (paclitaxel), y análogos al platino. (Bhatia, Tykodi et al. 2015). Sin embargo, el tratamiento en pacientes con melanoma en estadio IV ha cambiado durante los últimos años y típicamente incluye inmunoterapia o terapia molecular dirigida (DeSantis, Lin et al. 2014).

Entre los fármacos inmunoterapéuticos se encuentra el ipilimumab, un inhibidor de CTLA4, el cual aumenta la supervivencia en pacientes con melanoma avanzado (Hodi, O'Day et al. 2010). Entre los fármacos dirigidos a dianas moleculares se encuentran los inhibidores de BRAF v600 (vemurafenib, dabrafenib) (Tsai, Lee et al. 2008; Joseph, Pratilas et al. 2010) e inhibidores de MEK (trametinib) (Flaherty, Robert et al. 2012).

8. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS FRENTE A CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Varios estudios han demostrado la mayor resistencia de las CSCs respecto al resto de células tumorales a las terapias antitumorales convencionales, por lo que estos tratamientos suelen conllevar el

enriquecimiento del tumor en CSCs (Economopoulou, Kaklamani et al. 2012). Las CSCs son consideradas como la raíz del cáncer, por lo que la identificación y eliminación de estas células es crítica para la terapia. La mayoría de las terapias utilizadas actualmente se dirigen a células de rápido crecimiento, por lo que el lento crecimiento de estas células las protege de la eliminación por los fármacos actuales (Tirino, Desiderio et al. 2013). Por esta razón la inducción de la diferenciación puede tener un potencial terapéutico (Mallini, Lennard et al. 2014).

Una de las posibles estrategias terapéuticas frente a CSCs, consiste en la utilización de inhibidores de rutas de señalización implicadas en la autorrenovación celular que se encuentran desreguladas en CSCs. De este modo, el uso del ácido ursólico, un triterpenoide pentacíclico conocido por su actividad antitumoral en varios cánceres sólidos, podría actuar a través de la inhibición de la ruta Wnt (Park, Kwon et al. 2013), por lo que se encuentra en un estudio clínico en fase I siendo administrado junto a nanoliposomas (Zhu, Qian et al. 2013). Otro inhibidor de la ruta de señalización Wnt es la salinomicina, la cual lleva a cabo este efecto mediante la inhibición de LRP6 en células cancerígenas de mama y próstata (Lu and Li 2014). La salinomicina, aislada de *Streptomyces albus*, es un antibiótico poliéter de ácido monocarboxílico originalmente usado como fármaco anti-coccidial frente a bacterias, hongos, parásitos, y para producir una absorción de nutrientes más eficientes en cerdos. Este fármaco actúa como un ionóforo e interfiere con iones alcalinos, especialmente potasio, por lo que interfiere en el potencial transmembrana. Se ha demostrado que la salinomicina es 100 veces más efectiva que el paclitaxel y causa apoptosis mediante la activación de la caspasa-3, -8 y -9 en células de leiomioma uterino (Lee, Lee et al. 2014).

Por otra parte, la inhibición de la ruta de señalización SHh puede ser llevada a cabo por la ciclopamina mediante la antagonización con la proteína SMO (Bai, Zhao et al. 2014; Balbous, Renoux et al. 2014; Heiden, Williamson et al. 2014). El uso combinado de esta sustancia con paclitaxel antagoniza la quimiorresistencia de células de cáncer de mama *in vivo* e *in vitro* (Chai, Zhou et al. 2013). Otros inhibidores de SMO como iPi-926 (Sasaki, Gotlib et al. 2015)

y GDC-0449 (vismodegib) (Kim, Sahai et al. 2014) se encuentran en fase de ensayo clínico.

La inhibición de la proteína γ -secretasa, la cual libera el dominio intercelular de NOTCH es también una diana terapéutica, por lo que varias compañías farmacéuticas han desarrollado inhibidores de γ -secretasa que se encuentran inmersos en varios ensayos clínicos (Schott, Landis et al. 2013; Brana, Berger et al. 2014; De Jesus-Acosta, Laheru et al. 2014; Dantas-Barbosa, Bergthold et al. 2015; Lee, Moon et al. 2015; LoConte, Razak et al. 2015).

Otro mecanismo de resistencia a fármacos de CSCs es la sobreexpresión de transportadores ABC (Milane, Ganesh et al. 2011). Respecto a este mecanismo de resistencia, inhibidores de tirosin quinasa actúan uniéndose a ATP, previniendo su unión a varias tirosin quinasa oncogénicas. Así, se ha visto que el nilotinib reduce eficientemente la actividad de los transportadores ABCB1 y ABCG2 (Tiwari, Sodani et al. 2009), y sus efectos están siendo estudiados en un ensayo en fase clínica II para melanoma (Carvajal, Lawrence et al. 2015). Otro inhibidor de tirosin quinasa, el cual ya está siendo estudiado en pacientes con cáncer de mama metastásico es el Apatinib (YN968D1), el cual se dirige específicamente a VEGFR2 (Hu, Cao et al. 2014).

También puede considerarse como una terapia potencial la utilización de miRs terapéuticos, ya que estos ofrecen ciertas ventajas que los hacen buenos candidatos como terapia anticancerígena: a) su pequeño tamaño hace que sean fácilmente transportados por los fluidos corporales, b) la combinación de un *cluster* de miRs para diana el mismo gen podría disminuir la resistencia por mutación c) los miRs son menos antigénicos que los genes codificadores de proteínas, y d) su mecanismo de transporte es más simple debido a su pequeño tamaño (Leal and Leonart 2013).

Uno de estos miRs puede ser miR-34a, habiéndose demostrado *in vivo* que unido a adenovirus reduce el volumen tumoral en cerebelo (de Antonellis, Medaglia et al. 2011). Otro tipo de terapia potencial es la inhibición de miRs oncogénicos, los cuales comprenden la utilización de oligonucleótidos anti-

miRs (AMOs, del inglés *anti-miRNA oligonucleotide*), que incluyen varias modificaciones, como oligonucleótidos 2'-O-metil y LNAs, esponjas moleculares de miRs y miRs mascaradas (Leal and Leonart 2013). Son numerosos los estudios que han llevado a cabo la inhibición de miRs. En un estudio realizado por Asangani *et al* la inhibición de miR-21 provocó una disminución en la capacidad de migración e invasión en cáncer de colon, incrementando la expresión de la proteína supresora de tumores PDCD4 (Asangani, Rasheed et al. 2008). En otro estudio utilizando nanopartículas (NPs) de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) con inhibidores de miR-21 y miR-10b simultáneamente en cáncer de mama, se mostró un efecto inhibitorio de la metástasis y pro-apoptótico *in vivo* (Devulapally, Sekar et al. 2015). De la misma forma, mediante el uso de anti-miR-10b unido a NPs de polilisina se inhibió la capacidad invasiva de células de mama cancerígenas humanas *in vitro* (Jin, Yu et al. 2012). La vehiculización de miR-145 mediante el uso de otro tipo de vehiculizantes como NPs de polietilamida con un brazo corto de poliuretano (PU-PEI) a células CD133⁺ de glioblastoma, provoca la supresión de su quimiorresistencia (Yang, Chien et al. 2012). Además, la conjugación de anti-miR-155 con NPs de PLGA inhibió eficientemente el miR-155 endógeno y redujo significativamente el crecimiento de los tumores de leucemia y linfoma *in vivo* (Babar, Cheng et al. 2012).

Estas NPs, además de ser utilizadas para el transporte de miRs o anti-miRs, también han sido utilizadas para la vehiculización de fármacos, como las basadas en polímeros como el PLGA, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), poli (D,L-láctico) (PDLLA), quitosan, y PLGA-Polietilenglicol (PEG), las cuales han sido incluidas en varios ensayos clínicos (Devulapally and Paulmurugan 2014).

Un punto clave en el desarrollo de una terapia específica frente a CSCs, es un correcto aislamiento y caracterización de esta subpoblación de células cancerígenas, con el fin de desarrollar terapias dirigidas a moléculas que idealmente solo se expresen en CSCs.

HIPÓTESIS

El estudio de este trabajo se basa en las siguientes hipótesis:

- Las células madre cancerígenas (CSCs) están implicadas en la iniciación del tumor, así como en su mantenimiento y crecimiento, siendo las causantes, en parte, de la resistencia a las terapias convencionales, de la metástasis y de las recaídas de la enfermedad. Por tanto, el aislamiento y caracterización de CSCs es un proceso necesario, pero a la vez, difícil y caro, debido a entre otras causas a: su bajo porcentaje en el tumor, la baja especificidad de los marcadores que las distinguen de otras subpoblaciones, así como a sus requerimientos especiales de crecimiento. Así, el desarrollo de métodos que permitan su aislamiento de una forma más sencilla y menos costosa, es de gran utilidad para tener un mejor conocimiento de los mecanismos que regulan dichas CSCs y para el ensayo de diferentes estrategias dirigidas a este tipo de células. Basándonos en la característica de la mayor capacidad metastásica de las CSCs, es de esperar que en cultivos celulares aquellas células con baja adherencia al sustrato estén enriquecidas en propiedades *stem*.
- Los microRNAs actúan como los principales reguladores de una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo y traducción de señales. Su disfunción está relacionada con diversas patologías, incluyendo el cáncer, controlando mecanismos tan importantes como metástasis y resistencia al tratamiento. La identificación y caracterización de microRNAs ligados a la modulación de CSCs será de gran utilidad tanto a nivel diagnóstico como terapéutico.
- Las nanopartículas han demostrado ser unas herramientas de gran utilidad terapéutica vehiculizando tanto fármacos, como determinados genes, así como microRNAs de interés.
- Actualmente no hay fármacos selectivos eficaces frente a CSCs en el mercado, ya que los descritos son muy tóxicos y/o están en fases clínicas poco avanzadas. Por ello, es necesario aumentar nuestro conocimiento sobre estas subpoblaciones y diseñar y ensayar nuevos compuestos selectivos con baja toxicidad.

OBJETIVOS

1. Analizar si las células tumorales con menor capacidad de adherencia expresan características de células madre cancerígenas (CSCs) y de transición epitelio-mesénquima (EMT) *in vitro* e *in vivo*, y en tal caso, establecer un protocolo de enriquecimiento de CSCs en base a esta característica.
2. Seleccionar mediante predicción bioinformática microRNAs implicados en diferentes procesos carcinogénicos y validar su expresión en CSCs, células tumorales no *stem* y células no tumorales.
3. Determinar el efecto de nanopartículas de polietileno sobre células tumorales y su potencial terapéutico mediante la vehiculización de anti-miR-21-5p frente a CSCs.
4. Estudiar la actividad antiproliferativa y distribución *in vitro* de nuevos compuestos frente a subpoblaciones de células tumorales no *stem* y CSCs.

MATERIALS AND METHODS

1. CELL LINES AND CELL CULTURE

We used two established cell lines derived from two different human breast adenocarcinomas: MCF7 (reference ATCC HTB-22), an ER⁺/PR⁺/HER2⁺ breast cancer cell line; and MDA-MB-231 (reference ATCC HTB-26), a triple-negative (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) breast cancer cell line. For colon cancer studies we selected the following established cancer cell lines: T84 (reference ATCC CCL-248), a human colorectal carcinoma cell line derived from a lung metastasis; HT-29 (reference ATCC HTB-38), which was derived from a human colorectal adenocarcinoma; and HCT 116 (reference ATCC CCL-247), obtained from a human colorectal carcinoma. In addition, CCD-18Co (reference ATCC CRL-1459) cell line was used as a model of normal human colon cells. A-375 (reference ATCC CRL-1619) and G-361 (reference ATCC CRL-1424) cell lines, derived from two different human malignant melanomas, were used as highly tumorigenic models of melanoma. Finally, 293 (ATCC CRL-1573) cell line derived from a human embryonic kidney was used for transfection assays.

These cells lines were maintained with Dulbecco's-Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich) in a 75 cm² culture flask (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) unless otherwise indicated. All cells were grown at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Media were changed every 48-72 hours and cultured cells with a maximum of 80% confluence were passed. Briefly, culture medium was removed, cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) (Lonza, Basel, Switzerland) and detached enzymatically using 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich). After 5 minutes of incubation at 37°C with 5% CO₂ and 90% humidity, PBS containing 10% FBS and 1% P/S was added to the culture dishes and cell suspension recovered in sterile 50 mL tubes (BD Falcon) and spinning down at 1500 revolutions per minute (rpm) for 5 minutes (Centrifuge 5810R, Eppendorf Corp., Hamburg, Germany). Pellet cells were resuspended in culture media pre-warmed at 37°C and reseeded into

culture flasks. Cells were passed for less than 6 months, and routinely assayed for mycoplasma contamination.

All cell lines listed above were obtained from the cell culture bank of the Centre for Scientific Instrumentation at the University of Granada, and ultimately from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell lines were also tested for authentication using the short-tandem repeat profiling.

2. CELL CRYOPRESERVATION AND RECOVERY

Cells at low passage were cryopreserved at -180°C in liquid nitrogen. For that, culture medium was removed, cells were washed twice with PBS and incubated with 0.25% trypsin-EDTA at 37°C in 5% CO₂ and 90% humidity for 5 minutes. Then, PBS supplemented with 10% FBS and 1% P/S was added to the culture dishes and cell suspension was collected into sterile 50 mL tubes. Cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes, resuspended in freezing medium containing 93% FBS and 7% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) and placed into cryotubes (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total volume of 1 mL. Cryovials containing the cells were placed into an isopropanol cryo-freezing container (Sigma-Aldrich) at -80°C for 24 hours and, then, transferred into a liquid nitrogen tank at -180°C for their permanent storage.

For cell recovery, cryotubes containing frozen cells were thawed at 37 °C in a water bath and immediately cells were resuspended in fresh culture medium and spinning down for 5 minutes at 1500 rpm. Pellet cells were resuspended in culture media pre-warmed at 37°C and seeded into a 75 cm² culture flask.

3. CELL COUNT

To determine the number of cells contained in a cell suspension, the Neubauer chamber, also known as Hemocytometer (Zuzi Corp., France), was

used. The Neubauer chamber is a thick crystal slide with a central part where the counting grid has been set on the glass. This grid is 3 mm x 3 mm in size and has 9 square subdivisions of width 1 mm. A glass cover is placed on the top of the Neubauer chamber doing the depth of the chamber of 0.1 mm.

Cell counting was performed by diluting the cell suspension 1:1 with a 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich) and loading 10 μ L of this cell suspension into the Neubauer chamber with the glass cover placed on the top. Trypan blue solution was used to determine live cells within the cell suspension since these cells has an intact cytoplasmic membrane and therefore are not stained with this dye. Live cells were counted in 4 of the 9 square subdivisions using an optic microscope (Nikon model HF X-IIA, Nikon Corp., Japan) and cell number in the original cell suspension was calculated using the following formula: $Concentration \left(\frac{cells}{mL} \right) = \frac{Number\ of\ cells\ x\ 10000}{Number\ of\ squares} \times 2$, where "10000" comes from the volume contained in a square (0.1 μ L) and "2" from the dilution applied with the trypan blue solution.

4. ISOLATION AND/OR CHARACTERIZATION OF CANCER STEM CELLS

4.1. ALDEFLUOR ASSAY

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) enzyme activity in viable cells was determined by Aldefluor® kit assay (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. Aldefluor is supplied in the form of Bodipy™-aminoacetaldehyde-diethyl acetate (BAAA-DA, Figure 21A) which by itself is not a substrate of ALDH. BAAA-DA was dissolved in DMSO and exposed to hydrochloric acid to convert it into Bodipy™-aminoacetaldehyde (BAAA, Figure 21A) which is an uncharged fluorescent substrate for ALDH that can diffuse freely across the plasma membrane of intact viable cells. In the presence of ALDH, BAAA is converted into Bodipy™-aminoacetate (BAA, Figure 21A), which is retained inside the cell. To perform the assay, 1×10^6 cells were resuspended in 1 mL Aldefluor® assay buffer, that contains a transport

inhibitor, which prevents efflux of the BAA from the cells. Then, 5 μ L of BAAA was added to the cell suspension, 500 μ L were transferred into another tube and 5 μ L of the diethylamino-benzaldehyde (DEAB)-ALDH inhibitor was added. Both tubes were incubated for 30 minutes at 37°C in the dark. Then, cells were spin down at 1500 rpm 5 minutes at 4°C, resuspended in cold buffer and analyzed by flow cytometry.

This assay is based in the fact that intracellular ALDH converts BAAA into the fluorescent compound BAA, which is intracellularly retained because of its net negative charge, which disallows free diffusion. The brightly fluorescent ALDH-expressing cells (ALDH⁺ cells) were detected in the green fluorescence channel (520-540 nm), as recommended by manufacturer (Figure 21B), in a FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and data were analyzed using FACS DIVA software (BD Biosciences) or isolated by FACS ARIA III (BD Biosciences).

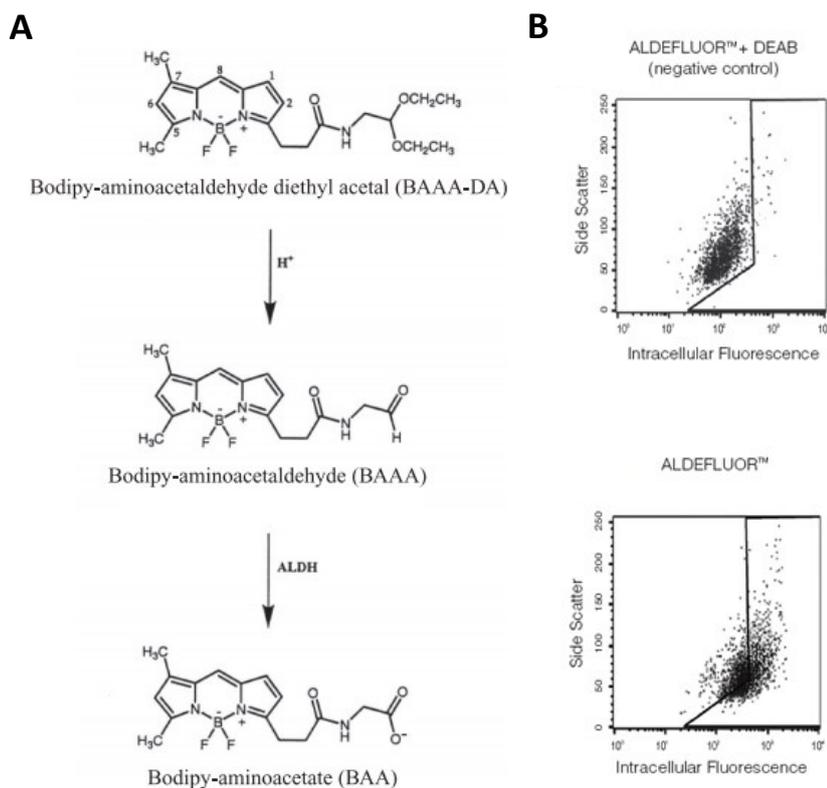


Figure 21. (A) Structure of BAAA-DA, BAAA and BAA. (B) Determination of ALDH activity in viable cells by flow cytometry using Aldefluor® kit assay (<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/ALDEFLUOR-Kit.aspx>).

4.2. HOECHST 33342 EFFLUX AND DETERMINATION OF THE SIDE POPULATION BY FLOW CYTOMETRY

Analysis of cells overexpressing ABC transporters with capacity to efflux drugs was performed using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) dye. Hoechst was added to 1×10^6 cells/mL, resuspended in DMEM with 10% FBS, to a final concentration of 5 μ g/ml, and incubated at 37°C for 90 min in the dark. For negative controls, 5 μ M verapamil (Sigma-Aldrich) was used for maintaining the

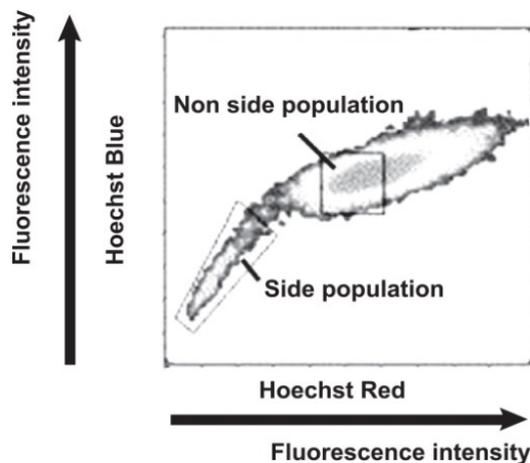


Figure 22. Side Population analysis. Study of cells stained with Hoechst 33342 by flow cytometry (Kayama, Kurokawa et al. 2007).

efflux channel closed inhibiting the capacity to efflux Hoechst 33342 by cells. After these 90 min, cells were spin down at 4°C and resuspended in cold PBS. The brightly fluorescent Hoechst 33342-positive cells were measured by flow cytometry in Hoesch blue (440/40) and Hoesch red (695/40) channels of a FACScan Aria III and data were analyzed using FACS DIVA software. Cells with the ability to efflux Hoechst 33342 and therefore were considered as the SP (Figure 22).

4.3. FLOW CYTOMETRY FOR CELL SURFACE MARKERS EXPRESSION

To determine the expression of cell surface proteins, cells were first washed twice with PBS and then resuspended in 100 μ L of blocking buffer, prepared by diluting 3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and 2mM EDTA in PBS, which blocks possible unspecific junctions of the antibodies with other cell surface proteins. After that, cells were spin down and 10 μ L of anti-human antibodies CD44-phycoerithrin (PE) and CD24-allophycocyanin (APC) were added to the cell suspension for breast cancer cell lines, CD44-PE, CD133-APC and CD326-fluorescein isothiocyanate (FITC) for colon cancer cell lines and CD44-PE and CD20-APC for melanoma cell lines (Miltenyi Biotec,

Auburn, CA, USA). Incubation with these antibodies was performed for 15 minutes at 4°C in the dark. Then, cells were centrifuged at 4°C and resuspended in cold PBS. The brightly fluorescent PE, APC and FITC were detected in the red (564-606 nm), blue (650-670 nm) and green (520-540 nm) fluorescence channels respectively, using a FACS CANTO II and data obtained were analyzed with FACS DIVA software.

4.4. TUMORSPHERE FORMATION ASSAY

The ability to generate tumorspheres in low-attachment surfaces under serum deprivation conditions, an indicator of the cell self-renewal ability, was carried-out in different subpopulations isolated by differential trypsinization and compared to total population (TP). Briefly, cells were resuspended in spheres culture medium, DMEM:F12 containing 1% P/S, 1X B27 (Gibco), 1X insulin transferrin selenium (ITS) (Gibco), 1 µg/mL Hydrocortisone, 4 ng/mL Heparin, 10 ng/mL EGF and 20 ng/mL FGF (Sigma-Aldrich), a medium designed for stem cells culture (Dey, Saxena et al. 2009). 3×10^3 cells per well were then seeded into 6-wells ultra-low attachment plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) and cultured for 6 days at 37°C in an humidified incubator with 5% CO₂. After that, spheres >75 µM diameter were counted using a Leica DM5500 B fluorescence microscope equipped with Leica CW4000 software (Leica, Solms, Germany), and representative images were taken.

4.5. COLONY FORMATION ASSAY

Clonogenic capacity of cells isolated by differential trypsinization was determined by colony formation assay in soft agar, and compared to TP. First, a base layer of 0.8% agar solution was added to the bottom of wells in a 6-well plate, in a total volume of 1 mL. To prepare this solution, 1.6% agar (Sigma-Aldrich) diluted in PBS was mixed 1:1 with DMEM supplemented with 20% FBS and 2% P/S. This base layer was left to solidify by incubating for 2 h at room temperature. Then, 10^4 cells were resuspended in 1 mL of a solution composed

of 0.8% agar diluted in PBS mixed 1:1 with DMEM supplemented with 20% FBS and 2% P/S, to obtain a final concentration of 0.4% agar, and then seeded onto the base layer.

After 21 days of culture at 37°C in an humidified atmosphere with 5% CO₂, adding 200 µL of medium DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S every 2 days, number of colonies per well was measured. For that, media was discarded and cells grown into soft agar were incubated with 0.5 mL of 0.01% Crystal Violet (Sigma-Aldrich) in PBS overnight. Colonies were counted using a Leica DM5500 B fluorescence microscope equipped with Leica CW4000 software.

5. LENTIVIRUS TRANSFECTION

293 cells were co-transfected using lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies). Briefly, 2.5 µg of a lentiviral vector encoding for the firefly luciferase and the red fluorescent protein td-Tomato (L2T) (Liu, Patel et al. 2010), 2.5 µg of a packaging vector (psPAX2) and 1 µg of an envelope vector (pCMV-VSVG), in a total volume of 250 µl of DMEM without serum or antibiotics, and mixed with 250 µl of DMEM without serum or antibiotics containing 15 µL Lipofectamine 2000. This mixture was added to 293 cells cultured in a 6 cm dish at 80% of confluence, and after 2-3 minutes of incubation at room temperature 3 mL of normal media (DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S) were added to the culture. Viral particles produced from 293 cells were collected and used to infect MDA-MB-231 cells. In brief, supernatant recovered after 48 hours from 293 transfected cells was filtered by a 0.45 µm pore membrane and added to MDA-MB-231 plated cells supplemented with 4 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich). After viral infection, td-Tomato⁺ cells were selected for stable integration of the transfectants by FACS.

6. XENOGRAFT *IN VIVO* ASSAY

All *in vivo* experiments were performed in female NOD scid gamma mice (NSG, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) purchased from Charles River (Barcelona, Spain). Animal welfare and experimental procedures were carried out in accordance with institutional (Research Ethics Committee of the University of Granada, Spain) and international standards (European Communities Council directive 86/609). All animals (n= 6 per group) were maintained in a microventilated cage system with a 12-h light/dark cycle, and were manipulated in a laminar air-flow cabinet to keep on the specific pathogen-free conditions.

For the induction of xenografts tumors, mice were anesthetized by inhalation of isoflurane, inoculated with 5×10^3 or 1.5×10^4 MDA-MB-231 cells by subcutaneously injections into the flank regions. Tumor growth was assessed twice weekly using a digital caliper and the tumor volume was calculated by the formula $V = (\text{length})^2 \times \text{width} \times \pi/6$.

7. EXPERIMENTAL LUNG METASTASIS *IN VIVO* ASSAY

2.5×10^5 MDA-MB-231 stable transfected cells (MDA-MB-231 L2T) were injected into the tail vein of 4-6 weeks old female NSG mice (n=6 per group). Bioluminescence was monitored by IVIS at day 0 and weekly by injecting intraperitoneally 150 mg/kg of D-Luciferine (Thermo Fisher Scientific). After 4 weeks, mice were euthanized and lungs were excised, photographed for td-Tomato expression and assayed for luciferase activity washing lungs with 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of D-luciferine diluted in PBS. Excised lungs were also used for hematoxylin and eosin (HE) staining and confocal microscopy analysis.

8. HISTOLOGICAL ANALYSIS

Lungs were immersed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 4 hours at 4°C, washed with PBS and embedded in paraffin in an automatic tissue processor

TP1020 (Leica). The paraffin blocks were cut into 4 mm sections for staining. Sections were deparaffinized with xylene, hydrated with decreasing alcohol concentrations (absolute to 75%), and stained with HE. Later, sections were dehydrated with increasing alcohol concentrations (75% to absolute), were cleared with xylene and mounted with mounting medium. Observation under light microscopy and digital image acquisition was carried out with an inverted microscope (Nikon H550s).

9. IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

Lungs were immersed in 10% formalin at room temperature overnight, washed with PBS, and preserved in 30% sucrose in PBS for 24 hours. Then, the samples were soaked in Optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek Europe B.V., Netherlands), frozen in liquid nitrogen and blocks were stored at -40°C until use. The OCT blocks were cut into 8 mm sections and collected on SuperFrost slides (Menzel-Glasser, Germany). The sections were hydrated with PBS and mounted with mounting medium with DAPI. Observation under fluorescent microscopy and digital image acquisition was carried out with a confocal microscope (Nikon A1).

10. GENE EXPRESSION ANALYSIS

10.1. BIOINFORMATICS MICRORNAs PREDICTION

Predictions were realized looking for miRs targeting mRNA of proteins that enhance or inhibit CSCs-related pathways. MiRs were selected based on three bioinformatics online tools: TargetScan 6.0., Pictar and miRanda-mirSVR. Predictions were selected based on the most favorable (lowest) context+ score (Garcia, Baek et al. 2011), higher probabilities and lowest sum of mirSVR scores, respectively.

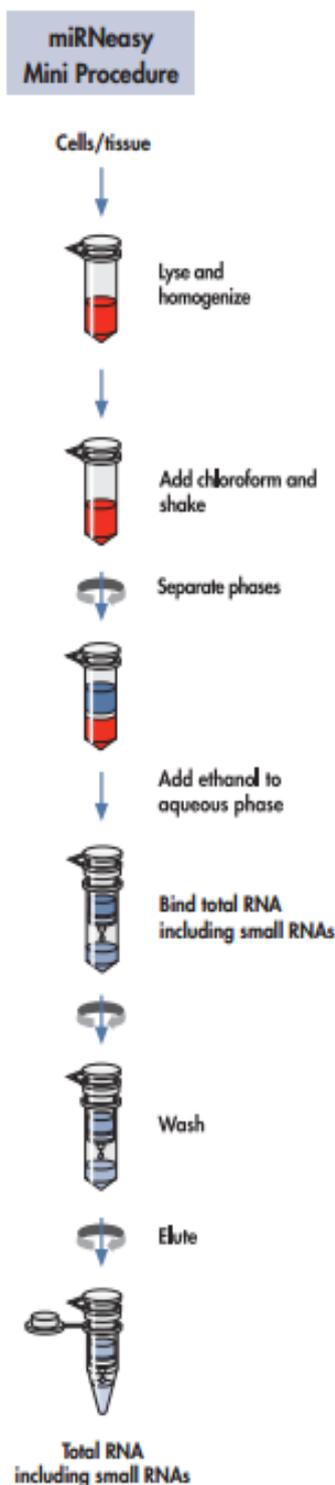


Figure 23. Total RNA extraction with miRNeasy Mini Kit. Protocol followed to extract total RNA, including miRs (<http://www.qiagen.com>).

10.2. TOTAL RNA EXTRACTION

Total RNA, including miRs, was extracted from the different cell lines and subpopulations obtained by differential trypsinization using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Limburgo, Netherland) following manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed twice with PBS and then lysed with 700 μ L QIAzol Lysis Reagent. After incubation for 5 min at room temperature, 140 μ L chloroform was added and samples were centrifuged for 15 min at 12,000 \times g at 4°C for phase separation. Aqueous phase, containing RNA, was transferred to a new tube and mixed with 100% ethanol. Samples were transferred into an RNeasy Mini spin column and centrifuged at $\geq 8000 \times$ g ($\geq 10,000$ rpm) for 15 s at room temperature to wash away phenol and other contaminants, retaining the total RNA binds to the membrane. After several washes with different solutions provided, total RNA was eluted adding 30–50 μ l RNase-free water directly onto the RNeasy Mini spin column membrane and centrifuging for 1 min at $\geq 8000 \times$ g ($\geq 10,000$ rpm) (Figure 23). RNA concentration and purity was measured using the spectrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), being considered optimum samples with a ratio Abs_{260}/Abs_{280} between 1.8 and 2.

10.3. REVERSE TRANSCRIPTION

In order to obtain cDNA from RNA extracted, we used two different protocols depending on RNA size. For mRNAs expression studies, cDNA was synthesized with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For that, 1 µg of total RNA was diluted in 15 µL of RNase-free water and mixed with 4 µl 5x iScript reaction mix and 1 µl iScript reverse transcriptase, as indicated by manufacturer. Reverse transcription was carried-out in a thermocycler model MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) by incubating 5 minutes at 25°C, then 30 minutes at 42°C, 5 minutes at 85°C and finally stored at 4°C.

On the other hand, reverse transcription from miRs were realized using the miRCURY LNA™ Synthesis kit II (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Reaction was performed with 800 ng of total RNA diluted in 13 µL of RNase-free water, 4 µL of 5x Reaction Buffer, 2 µL enzyme mix and 1 µL of UniSp6 RNA Spike-in template, a synthetic RNA, by incubating 60 minutes at 42°C, 5 min at 95°C and stored at 4°C, following manufacturer's protocol.

10.4. QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay for amplification of target cDNAs was performed using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) and miRCURY LNA™ EXILENT SYBR Green (Exiqon), for mRNAs and miRs respectively. qRT-PCR was carried-out in a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad), using the following protocols: for mRNAs, 3 minutes at 95°C and then 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C; for miRs, 10 minutes at 95°C for polymerase activation and cDNA denaturalization, and 40 cycles of 95°C for 10 seconds and 60°C for 1 minute, with a ramp rate of 1.6°C per second.

Each reaction was performed in triplicate and the comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the amplification factor. Human GAPDH was used as internal control for mRNAs. UniSp6 RNA Spike-in control

primer set, SNORD44 and hsa-miR-24c-3p were used as internal control for miRs. UniSp6 RNA Spike-in control primer set is used to amplify UniSp6 RNA Spike-in template for the control of the cDNA synthesis steps. The standard curve was constructed by 5-fold serial dilutions of cDNA. Primer sequences for mRNA are listed in Table 4. Data were normalized to 1 for ALDH⁺ subpopulation or TP (MDA-MB-231 or CCD-18Co) depending on the experiment.

Table 4. Primer sequences used for qRT-PCR

Gene	Primer Sequence	
CLDN1	Forward	5' GCGCGATATTTCTTCTTGCAGG 3'
	Reverse	5' TTCGTACCTGGCATTGACTGG 3'
CXCL10	Forward	5' CCAGAATCGAAGGCCATCAA 3'
	Reverse	5' CATTTCCTTGCTAACTGCTTTCAG 3'
SNAIL	Forward	5' ACCCCACATCCTTCTCACTG 3'
	Reverse	5' TACAAAAACCCACGCAGACA 3'
SLUG	Forward	5' TGCGATGCCAGTCTAGAAA 3'
	Reverse	5' TTCTCCCCCGTGTGAGTTC 3'
ECAD	Forward	5' AATTCCTGCCATTCTGGGGA 3'
	Reverse	5' TCTTCTCCGCCTCCTTCTTC 3'
NCAD	Forward	5' TGAGCCTGAAGCCAACCTTA 3'
	Reverse	5' AGGTCCCCTGGAGTTTTCTG 3'
VIM	Forward	5' AGCTAACCAACGACAAAGCC 3'
	Reverse	5' TCCACTTTGCGTTCAAGGTC 3'
BMI1	Forward	5' GCTGCCAATGGCTCTAATGAA 3'
	Reverse	5' TGCTGGGCATCGTAAGTATCTT 3'
OCT4	Forward	5' CACCATCTGTGCTTCGAGG 3'
	Reverse	5' AGGGTCTCCGATTTGCATATCT 3'

10.5. DETERMINATION OF STABLE HOUSEKEEPING GENES

The stabilities of candidate reference miRs were evaluated using RefFinder, a user-friendly web-based comprehensive tool for evaluating and screening reference genes from extensive experimental datasets. RefFinder integrates the currently available major computational programs, like Normfinder, BestKeeper and comparative ΔCt method algorithms, to separately and comprehensively compare and rank the tested candidate reference genes with the data obtained for all subpopulations or cell types studied.

- NormFinder: this method combine intra- and intergroup variations, let a stability value that represents a practical measure of systematic error that will be introduced when using the investigated gene (Andersen, Jensen et al. 2004).
- BestKeeper: in this program descriptive statistics of the derived crossing points (CP) are computed for each housekeeping gene (HKG) including the geometric mean (GM), arithmetic mean (AM), minimal (Min) and maximal (Max) value, standard deviation (SD), and coefficient of variance (CV). The x-fold over- or under-expression of individual samples towards the geometric mean CP are calculated and the multiple factor of their minimal and maximal values, expressed as the x-fold ratio and its standard deviation, are presented.

$$\text{Min}[x_fold] = \text{Emin}[CP] - \text{GM}[CP]$$

$$\text{Max}[x_fold] = \text{Emax}[CP] - \text{GM}[CP]$$

The estimation of HKG expression stability is based on the inspection of calculated variations (SD and CV values). According to the variability observed, HKGs can be ordered from the most stably expressed, exhibiting the lowest variation, to the least stable one, exhibiting the highest variation. Any studied gene with the SD higher than 1 can be considered inconsistent (Pfaffl, Tichopad et al. 2004).

- Comparative ΔCt method: this method compares relative expression of 'pairs of genes' within each sample to identify useful housekeeping genes. If the ΔCt value between two genes remains constant, when is analyzed in different samples, it means either both genes are stably expressed among those

samples, or co-regulated (here it is assumed the stability of both genes). However, if the ΔCt fluctuates, then 1 or both genes are variably expressed. Taking all the genes into account and by comparing all possible gene combinations, a pattern forms whereby genes tend to be associated with either increased or decreased levels of deviation in ΔCt among the samples, and hence, either an increase or decrease in the level of variability in gene expression (Silver, Best et al. 2006).

11. NANOPARTICLES ASSAYS

11.1. NANOPARTICLES SYNTHESIS

Nanoparticles (NPs) were synthesized by Dr. Sánchez-Martín's lab. 460 nm aminomethyl polystyrene NPs were prepared by dispersion polymerization as previously described (Sanchez-Martin, Muzerelle et al. 2005). Functionalized cross-linked polystyrene NPs were fluorescently labelled with Cy5 for tracking them into cells. Four samples of NPs were evaluated: (a) naked polystyrene NPs, (b) Cy5 labelled amino functionalized NPs VCC 506.4 (-NH₂), (c) Cy5 labelled NPs functionalized with dithiopropionic acid VCC 506.3 (-COOH) and (d) NPs conjugated to anti-miR21-5p (Figure 24).

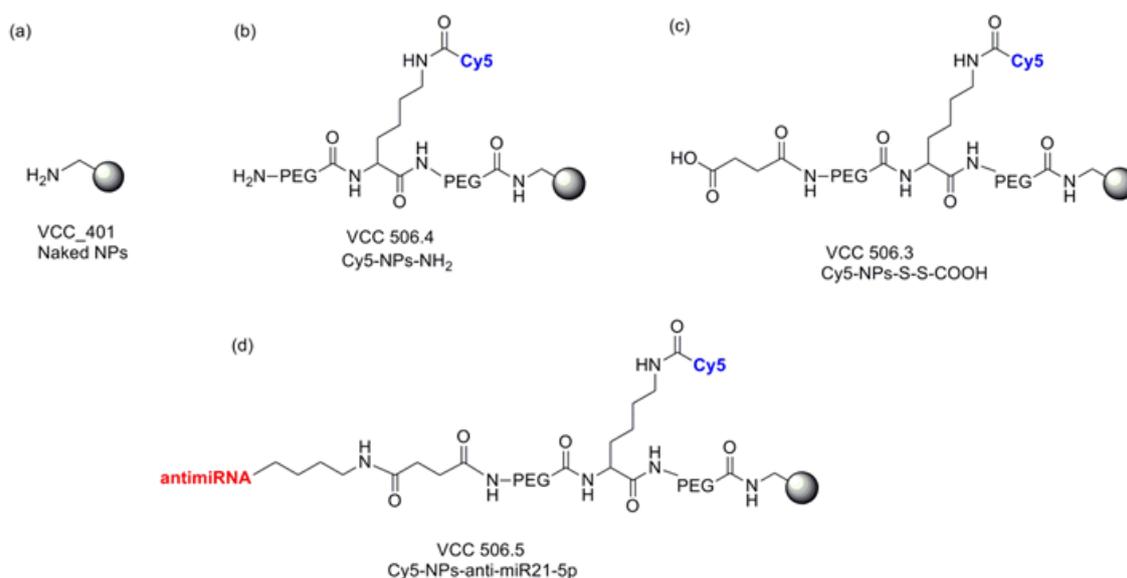


Figure 24. Schematic structure of functionalized NPs (Sanchez-Martin, Muzerelle et al. 2005)

11.2. EFFECT OF NANOPARTICLES ON CELL PROPERTIES

5×10^4 G-361 cells were seeded into 24-well plates using 500 μ L of DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. 24 hours later 6.5×10^3 naked 460 nm polystyrene NPs resuspended in medium were added to the cell culture. After 8 hours of incubation, medium with NPs was removed, cells were washed with PBS and fresh medium was added. 72 hours later cells were used for determination of ALDH activity, cell cycle distribution and apoptosis by flow cytometry and for qRT-PCR analysis.

11.3. EFFICIENCY OF NANOPARTICLES INTERNALIZATION

ALDH⁺ G-361 cells were isolated by FACS and seeded into 6-well ultra-low attachment plates using spheres medium for their recovery. 24 hours later, 5×10^4 ALDH⁺ cells per well were seeded into 24-well ultra-low attachment plates in spheres medium and 6.5×10^3 , 12.5×10^3 , 2.5×10^4 or 5×10^4 NPs/cell were added to the cell culture and incubated 1, 2, 4 or 8 hours. Three types of NPs were used, VCC 506.3, with a -COOH termination, and VCC 506.4, with a -NH₂ termination, both labeled with Cy5 and Cy5-NPs conjugated to anti-miRNA. After incubation, cells were recovered and used for determining the efficiency of NPs internalization by flow cytometry using a FACS CANTO II and data obtained were analyzed with FACS DIVA software.

11.4. ANTI-MIR-21-5P LOADED NANOPARTICLES ASSAY

ALDH⁺ G-361 cells were isolated by FACS and seeded into 6-well ultra-low attachment plates using spheres medium for their recovery. 24 hours later, 5×10^4 ALDH⁺ cells per well were seeded on 24-well ultra-low attachment plates per well with spheres medium and 12.5×10^3 VCC 506.4 or anti-miR-21-5p linked to NPs per cell diluted on media were added to the cell culture and incubated for 4 hours. Then, cells were recovered, spin down at 1500 rpm for 5 minutes and reseeded on 24-well ultra-low attachment plates per well in spheres medium. Representative images of cells were taken using a Leica

DM5500 B fluorescence microscope equipped with Leica CW4000 software 24 hours later.

12. DRUGS AND TREATMENTS

12.1. DRUGS

The design and synthesis of 5-FU derivatives, purine (Figure 25) and *p*-Nitrobenzene- (Figure 26) and dansyl (Figure 27)-sulfonamides compounds were carry-out by Dr. Joaquin Campos Rosa's lab (Departament of Pharmaceutical Chemistry of University of Granada), and their molecular weight are shown in Table 5. All synthesized compounds were dissolved in DMSO and stored at -20 °C. For each experiment, the stock solutions were further diluted in medium to obtain the desired concentrations. The final solvent concentration in cell culture was $\leq 0.1\%$ v/v of DMSO, a concentration without effect on cell replication. Parallel cultures of cells in medium with DMSO were used as controls.

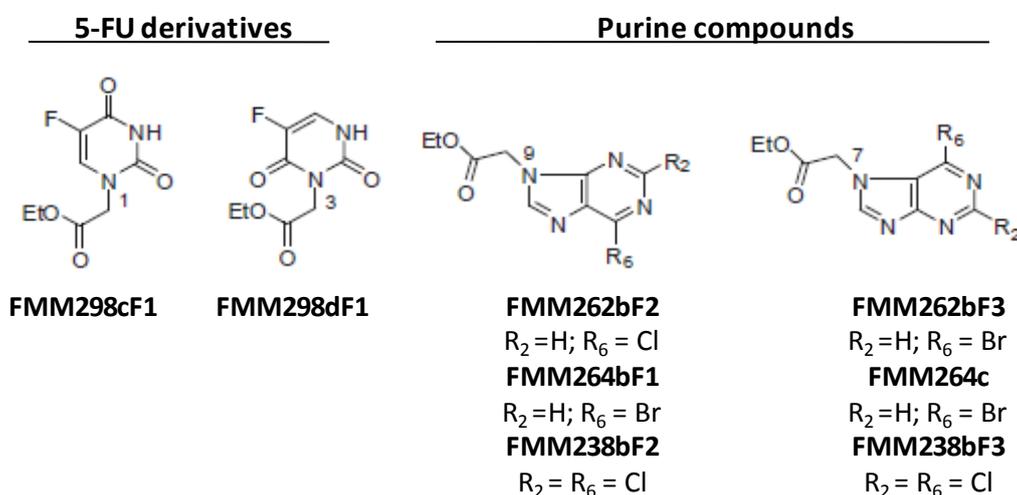


Figure 25. Structure of *N*-1 (FMM298cF1) and *N*-3 (FMM298dF1) 5-FU derivatives, *N*-9 (FMM262bF2, FMM264bF1, FMM238bF2) and *N*-7 (FMM262bF3, FMM264c, FMM238bF3) purine compounds.

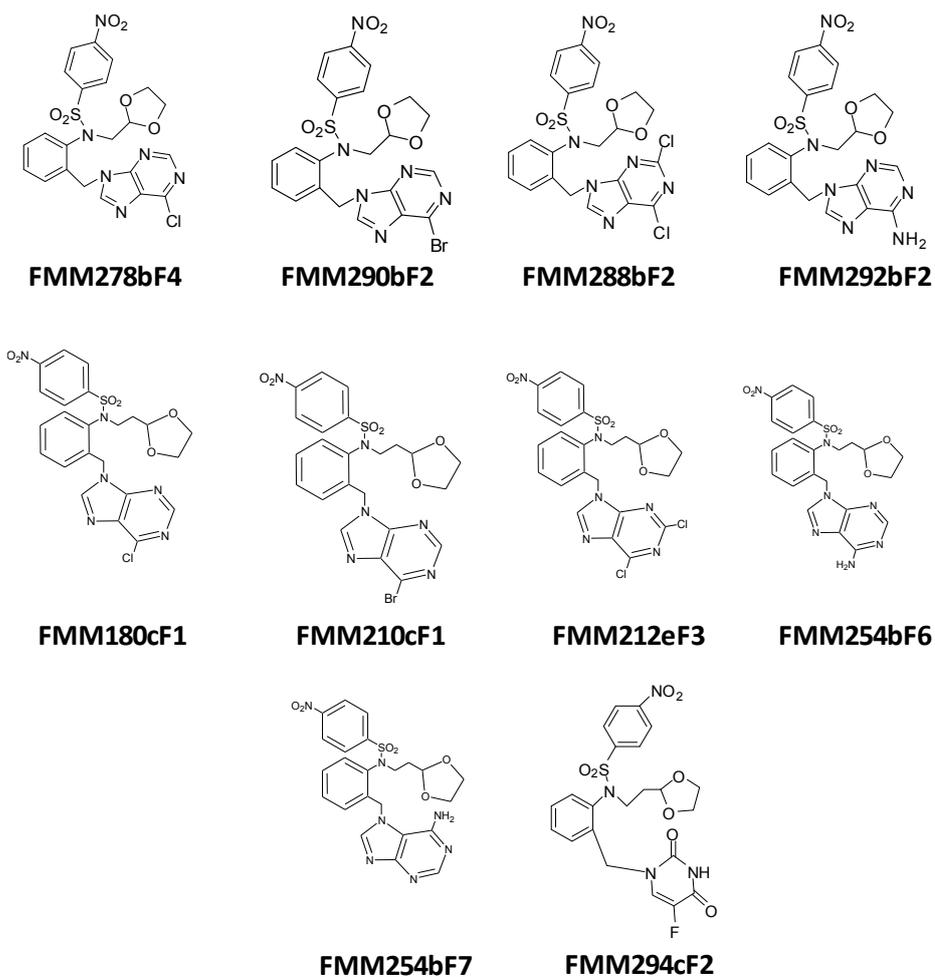


Figure 26. Structure of *p*-Nitrobenzenesulfonamide compounds.

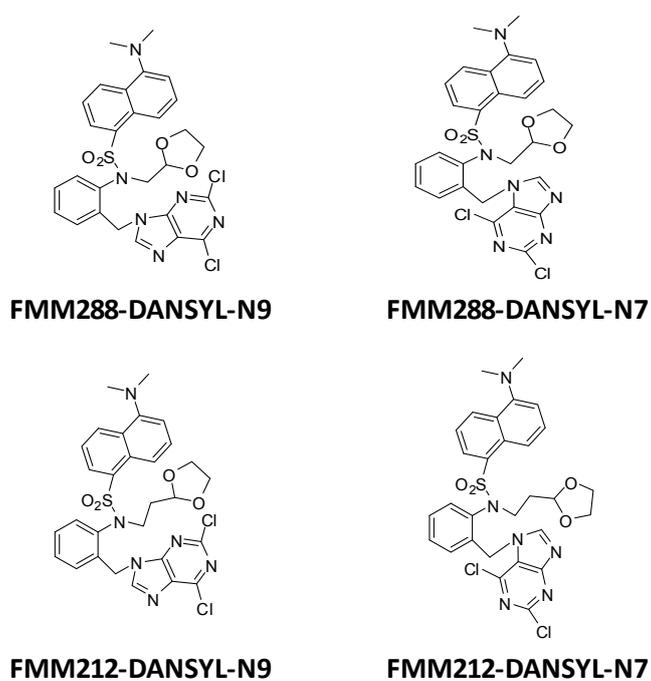


Figure 27. Structure of dansyl analogues compounds.

Table 5. Molecular weight for the different compounds.

COMPOUND	FORMULES	MOLECULAR WEIGHT (G/MOL)
FMM298cF1	$C_8H_9FN_2O_4$	216.17
FMM 298dF1	$C_8H_9FN_2O_4$	216.17
FMM262bf2	$C_9H_9ClN_4O_2$	240.65
FMM264bF1	$C_9H_9BrN_4O_2$	285.10
FMM238bf2	$C_9H_8Cl_2N_4O_2$	275.09
FMM262bf3	$C_9H_9ClN_4O_2$	240.65
FMM264c	$C_9H_9BrN_4O_2$	285.10
FMM238bF3	$C_9H_8Cl_2N_4O_2$	275.09
FMM278bF4	$C_{22}H_{19}ClN_6O_6S$	530.08
FMM290bF2	$C_{22}H_{19}BrN_6O_6S$	575.39
FMM288bF2	$C_{22}H_{18}Cl_2N_6O_6S$	565.39
FMM292bF2	$C_{22}H_{21}N_7O_6S$	511.13
FMM180cF1	$C_{23}H_{21}ClN_6O_6S$	544.97
FMM210cF1	$C_{23}H_{21}BrN_6O_6S$	589.42
FMM212eF3	$C_{23}H_{20}Cl_2N_6O_6S$	579.41
FMM254bF6	$C_{23}H_{23}N_7O_6S$	525.54
FMM254bF7	$C_{23}H_{23}N_7O_6S$	525.54
FMM294cF2	$C_{22}H_{21}FN_4O_8S$	520.49
FMM288-DANSYL-N9	$C_{28}H_{26}Cl_2N_6O_4S$	612.11
FMM288-DANSYL-N7	$C_{28}H_{26}Cl_2N_6O_4S$	612.11
FMM212-DANSYL-N9	$C_{29}H_{28}Cl_2N_6O_4S$	627.54
FMM212-DANSYL-N7	$C_{29}H_{28}Cl_2N_6O_4S$	627.54

12.2. *IN VITRO* CYTOTOXICITY ASSAYS

The cytotoxic effect of anticancer drugs on attached cells was assessed using the sulforhodamine-B (SRB) colorimetric assay. Briefly, 1×10^3 cells/well were seeded into 24-well plates and incubated for 24 hours. Then, cells were treated with different concentrations of drugs in their respective culture medium. Cells were maintained in culture for six day changing media at day 3 using fresh

media supplemented with drugs. Then, media were removed from the wells, and cells were fixed and stained with SRB. Fixation was performed by treating cells with 300 μL /well of cold 10% trichloroacetic acid (TCA) and incubating at 4°C for 20 minutes. Then, cells were washed three times with water and left to dry. The fixed cells were stained for 20 minutes with 500 μL of 0.4% (w/v) SRB dissolved in 1% acetic acid in a shaker. Wells were rinsed with 1% acetic acid and air dried. Bound dye was solubilized with 500 μL of 10 mM Tris base (pH 10.5) in a shaker during 10 min. Finally, three aliquots of 100 μL of each well were transferred to a 96-well plate and absorbance at 492 nm was measured in a Titertek Multiscan apparatus (Flow, Irvine, Ca, USA).

The effect of anticancer drugs on ALDH⁺ A-375 cells isolated by FACS was assessed using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich). 3×10^3 ALDH⁺ A-375 cells/well were seeded into 96-well ultra-low attachment plates in 100 μL of spheres medium per well and 24 hours later FMM180cF1 and FMM212eF3 compounds were added at different concentrations. Three days later 10 μL of MTT (5 mg/mL stock solution) was added per well and incubated for 3-4 hours at 37°C in the dark. Finally, plates were read in a Titertek Multiscan apparatus at 570 nm. The principle of this method is that the dissolved MTT is converted to an insoluble purple formazan by cleavage of the tetrazolium ring by active mitochondrial dehydrogenases of living cells, but dead cells do not cause this change.

We evaluated the linearity of the SRB and MTT assays with a cell number for each cell line before every cell growth experiment. The IC₅₀ values were calculated from semi-logarithmic dose-response curves by linear interpolation. All of the experiments were performed in triplicate and were carried-out at least twice.

12.3. FLUORESCENCE DETECTION AND CONFOCAL IMAGING

MCF7 breast cancer cells, HCT 116 colon cancer cells and A-375 melanoma cells were seeded into 96 wells plates (1×10^3 cells/well) and treated with 10 μM of FMM212-DANSYL-N9 for 30 minutes, 1 hour or 2 hours. After

that, 96 wells plates were read with PowerWave X (Biotek Instruments. Inc) ($\lambda_{ex}=340/30$; $\lambda_{em}=450/450$). A-375 melanoma cells were harvested on 13 mm \varnothing coverslips in a 24 well plate, and were treated for 30 minutes, 1 hour or 2 hours with a concentration of 10 μ M of FMM212-DANSYL-N9. Imaging experiments were conducted with a Zeiss LSM 710 laser-scanning microscope using a tissue culture chamber (5% CO₂, 37 °C) with a Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC m27. Images were processed with Zen Lite 2012 software.

13. CELL CYCLE ANALYSIS

Cells were detached and washed with PBS. Then, 700 μ L of cold ethanol at 70%, stored at -20°C, was added to the cells in shake. Cells were incubated at -20°C at least 20 minutes. Then ethanol was eliminated spinning down at 2500 rpm 5 minutes. Cells were washed with PBS and 250 μ L of a solution with 40 μ L/mL of propidium iodide (PI) and 100 μ L/mL of RNAsa was added. Cells were incubated at 37°C 30 min in dark and analyzed by flow cytometry using a FACS CANTO II and data obtained were analyzed with ModFit LT™ software (Verity Software House, Topsham, ME, USA) (Figure 28).

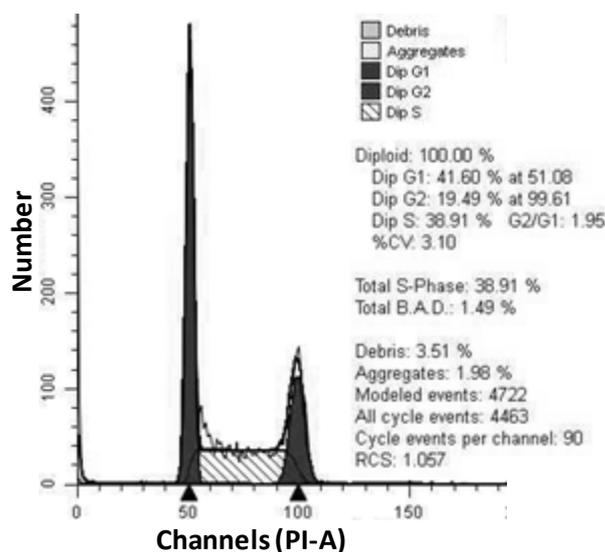


Figure 28. Cell cycle distribution obtained by flow cytometry.

14. APOPTOSIS ASSAY

Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) was used to detect apoptosis by flow cytometry. Firstly, cells were collected and washed once with 1X PBS and once with 1X Binding Buffer (1 mL 10X Binding Buffer + 9 mL dH₂O). Then, cells were resuspended in 100 μ L of 1X Binding Buffer at $1-5 \times 10^6$ cells/mL. 5 μ L of fluorochrome-conjugated Annexin V were added to the cell suspension and incubated for 10-15 minutes at room temperature, protected from light. After that, cells were washed with 2 mL 1X Binding Buffer and then resuspended in 200 μ L of 1X Binding Buffer. 5 μ L of PI Staining Solution were added to the cells, maintained on ice in the dark and analyzed by flow cytometry using a FACS CANTO II. Data obtained were analyzed with FACS DIVA software.

Annexins are a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins that preferentially bind phosphatidylserine (PS). Under normal physiologic conditions, PS is predominantly located in the inner leaflet of the plasma membrane. Upon initiation of apoptosis, PS loses its asymmetric distribution across the phospholipid bilayer and is translocated to the extracellular membrane leaflet making cells as targets of phagocytosis that can be detected by fluorescently labeled Annexin V. In early-stage of apoptosis, the plasma membrane excludes viability dyes such as PI. These cells will stain with Annexin V but not a viability dye, thus distinguishing cells in early apoptosis. However, in late stage apoptosis, the cell membrane loses integrity thereby allowing Annexin V and PI to access in the interior of the cell (Figure 29).

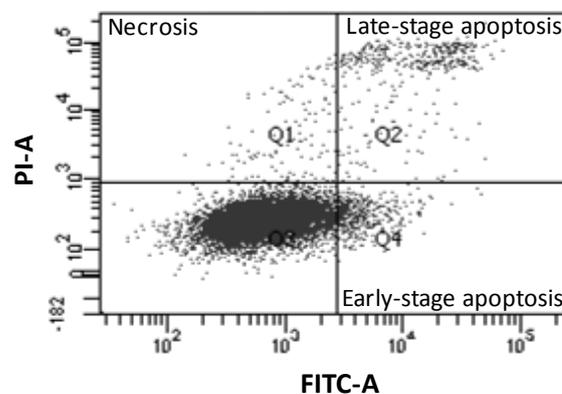


Figure 29. Illustrative image of apoptosis analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

All graphed data are presented as mean \pm SD or SEM from at least three experiments. Two-tailed Student's t-tests and two-way ANOVA were used to determine statistical differences for *in vitro* and *in vivo* experiments respectively. $p < 0.05$ were considered statistically significant in all cases.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES ENRIQUECIDAS EN CÉLULAS CON CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS EN BASE A SU CAPACIDAD DE ADHESIÓN

1.1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES BASADO EN LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN

La identificación y el aislamiento de CSCs es un punto clave para su utilización en estudios posteriores. Para ello desarrollamos un método basado en la capacidad de adhesión diferencial de las diferentes subpoblaciones de células cancerígenas, que a diferencia del FACS es fácil, no agresivo y económico.

Para ello, cuando las células sembradas en placas de 150 mm alcanzaron el 60-80% de confluencia fueron lavadas con PBS lentamente, sin dirigir el flujo directamente sobre las mismas, evitando de esta forma que las células se despeguen de la placa de cultivo por acción mecánica. Posteriormente, se les añadió tripsina-EDTA diluida al 0.05% y se incubaron 2 minutos a 37°C. Seguidamente, se añadió cuidadosamente PBS suplementado con 10% FBS y 1% P/S para inactivar la tripsina. La subpoblación recuperada durante este proceso se llamó Tripsina-Sensible 1 (TS₁). Las células restantes que quedaron adheridas en la superficie de cultivo fueron lavadas dos veces con PBS y despegadas con 0.25% tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C. Esta subpoblación fue llamada Tripsina-Resistente 1 (TR₁). Además, para aislar una subpoblación más pura de células con baja adherencia, las células TS₁ fueron sembradas de nuevo durante 24 horas en placas de 100 mm. Posteriormente, el proceso de selección desarrollado anteriormente para la obtención de la subpoblación TS₁ fue llevado a cabo de nuevo sobre estas células. La subpoblación de células recuperadas fue nombrada como Tripsina-Sensible 2 (TS₂). Durante todo el estudio la TP de las células cultivadas en medio suplementado con 10% FBS fue utilizada como control (Figura 30).

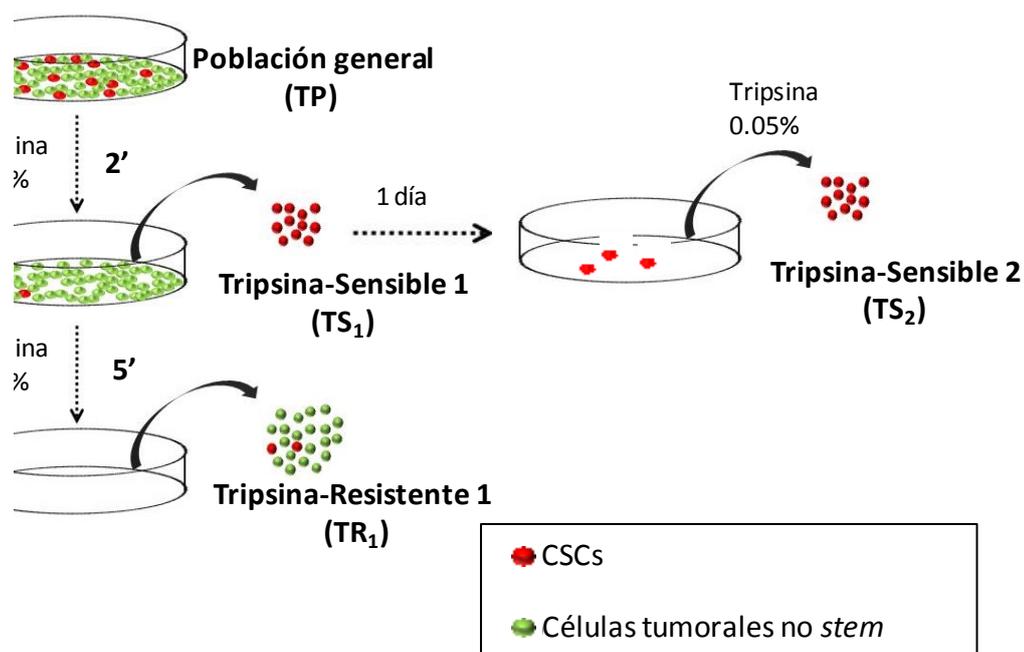


Figura 30. Protocolo de aislamiento de una subpoblación enriquecida en CSCs en base a su capacidad de adhesión.

1.2. LAS SUBPOBLACIONES CON MENOR CAPACIDAD DE ADHESIÓN POSEEN CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS RELACIONADAS CON CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Para comprobar si las subpoblaciones TS poseían un enriquecimiento de propiedades fenotípicas características de CSCs, determinamos la actividad ALDH, la proporción de SP y de marcadores de superficie específicos de CSCs.

Respecto a la actividad ALDH, las subpoblaciones TS₁ y TS₂ de todas las líneas tumorales analizadas presentaron una significativa mayor proporción de células positivas para Aldefluor que las células de TP, a excepción de la subpoblación TS₂ de la línea celular HT-29, la cual no mostró tanta actividad. En contraste, la subpoblación TR₁ poseía una menor actividad ALDH, aunque estos cambios no fueron significativos respecto a TP (Figura 31).

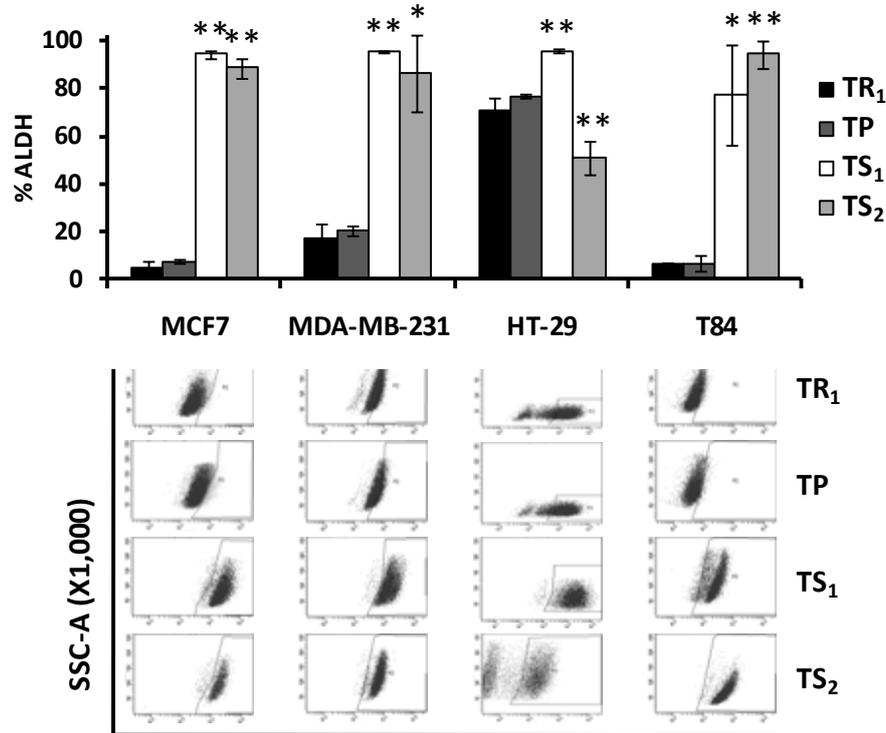


Figura 31. Porcentaje de células ALDH⁺ en cada subpoblación celular comparada con TP en las líneas MCF7, MDA-MB-231, HT-29 y T84. Datos mostrados como media \pm SD (** p < 0.01; * p < 0.05). En la parte inferior se muestra el dot-plot representativo para todas las subpoblaciones y TP de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, HT-29 y T84 (de izquierda a derecha).

De acuerdo con los datos obtenidos en el ensayo de Aldefluor, la proporción de SP en las subpoblaciones TS de todas las líneas celulares fue significativamente mayor que en TP y TR₁. Así la subpoblación TS₁ mostró un rango de valores desde 48.6% a 70.5% y TS₂ desde 82.3% hasta 89.9% (Figura 32).

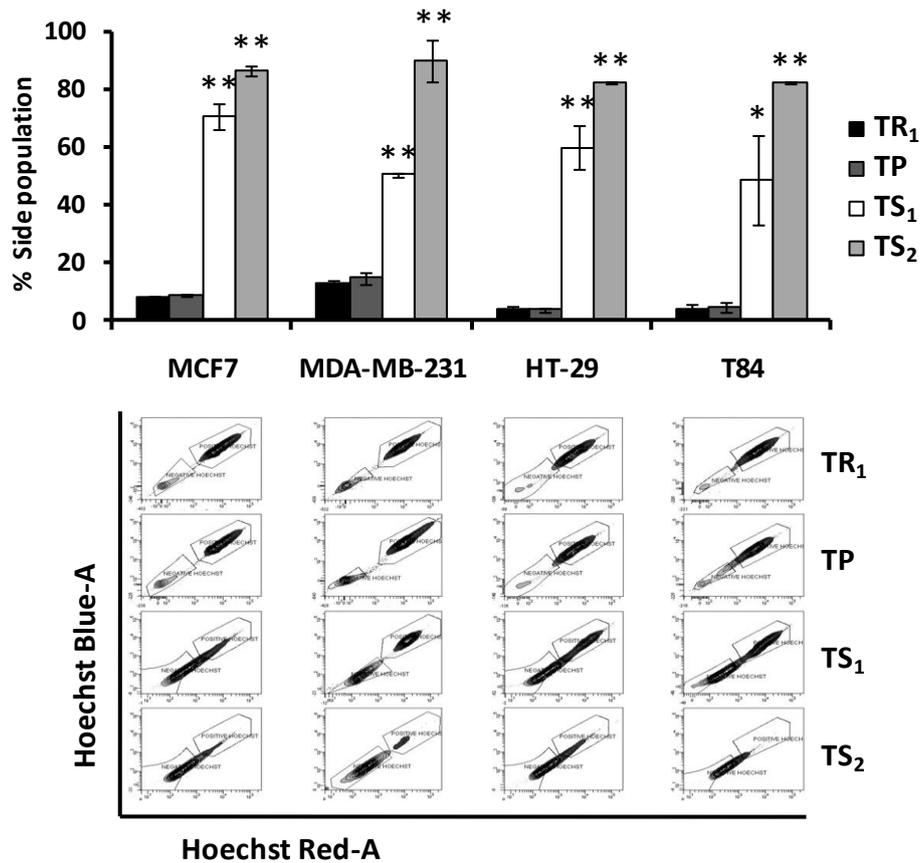


Figura 32. Proporción de SP en cada subpoblación celular comparada con TP en las líneas MCF7, MDA-MB-231, HT-29 y T84. Datos mostrados como media \pm SD (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). En la parte inferior se muestra el dot-plot ilustrativo para todas las subpoblaciones de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, HT-29 y T84.

Además, analizamos la expresión de los marcadores superficiales característicos de CSCs, CD44/CD24 en las líneas de cáncer de mama, y los marcadores CD44/CD133/CD326 en las líneas de cáncer de colon. Nuestro análisis indica que las subpoblaciones TS₁ y TS₂ de la línea MCF7 muestran una significativa mayor proporción de células con fenotipo CD44⁺/CD24⁻ que TP y TR₁ (Figura 33A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para estos marcadores entre las diferentes subpoblaciones de la línea MDA-MB-231, probablemente debido a la alta expresión basal que posee TP en dicha línea tumoral (Figura 33B).

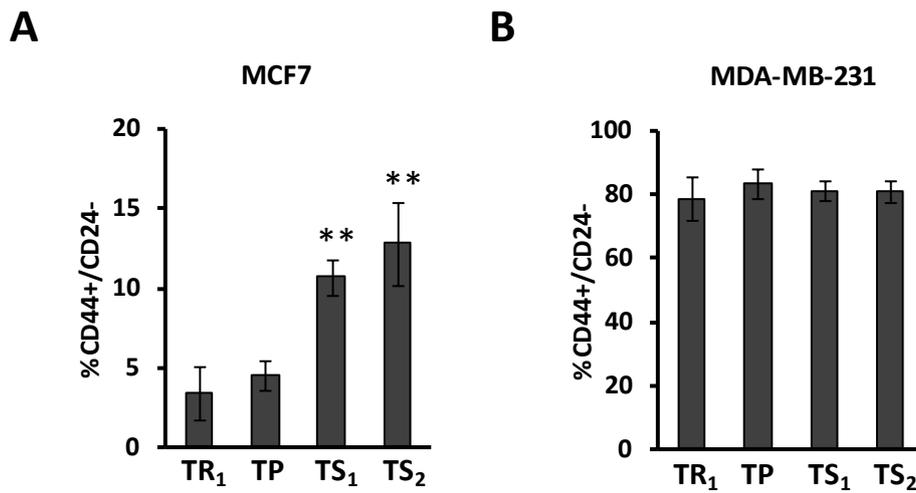


Figura 33. Porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en TR₁, TP, TS₁ y TS₂ aisladas de las líneas (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231. Datos mostrados como media ± SD (** p < 0.01; * p < 0.05).

En la línea de cáncer de colon HT-29 la proporción de células con fenotipo CD44⁺/CD133⁺/CD326⁺ fue significativamente mayor para TS₁ y TS₂ en comparación con TR₁, aunque solo TS₂ mostró un incremento significativo en la proporción de células con este fenotipo comparado con TP (Figura 34A). Es importante resaltar que las células HT-29 mostraron dos subpoblaciones diferentes basadas en la expresión de CD326, siendo separadas como células HT-29 CD326^{high} y CD326^{low}, estando las subpoblaciones TS compuestas por células con fenotipo CD326^{high} (Figura 34B).

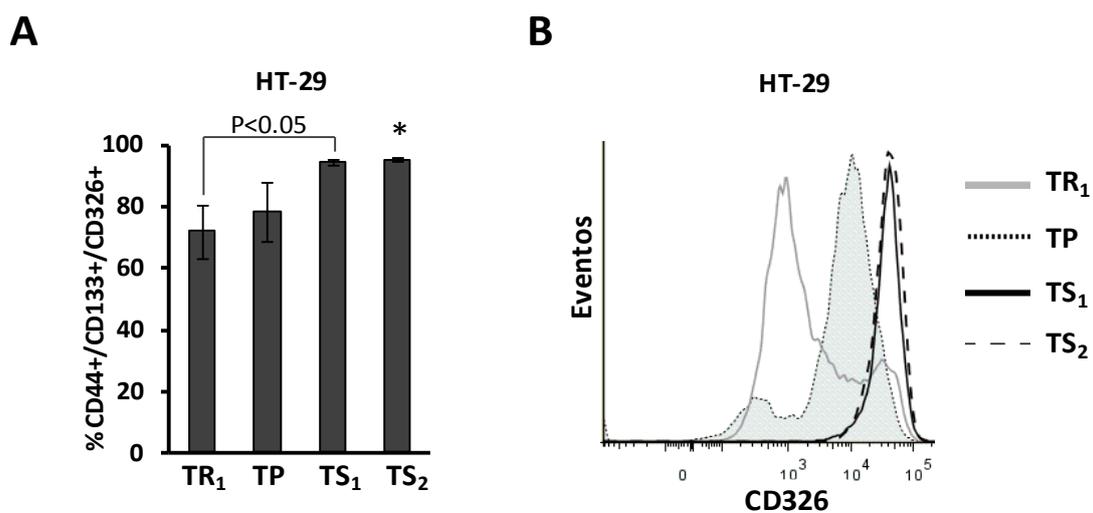


Figura 34. (A) Porcentaje de células CD44⁺/CD133⁺/CD326⁺ y (B) cambios en la expresión de CD326 en TR₁, TP, TS₁ y TS₂ en la línea celular HT-29. Datos mostrados como media ± SD (** p < 0.01; * p < 0.05)

Respecto a las células de cáncer de colon de la línea T84, las subpoblaciones TS₁ y TS₂ mostraron un mayor enriquecimiento en células con fenotipo CD44⁺/CD326⁺, incluso cuando la expresión de estos marcadores fue estudiada por separado (Figura 35A,B,C). Sin embargo, las diferencias en la expresión de CD133 no fueron significativas, aunque este marcador superficial se expresó más en las subpoblaciones TS (Figura 35D).

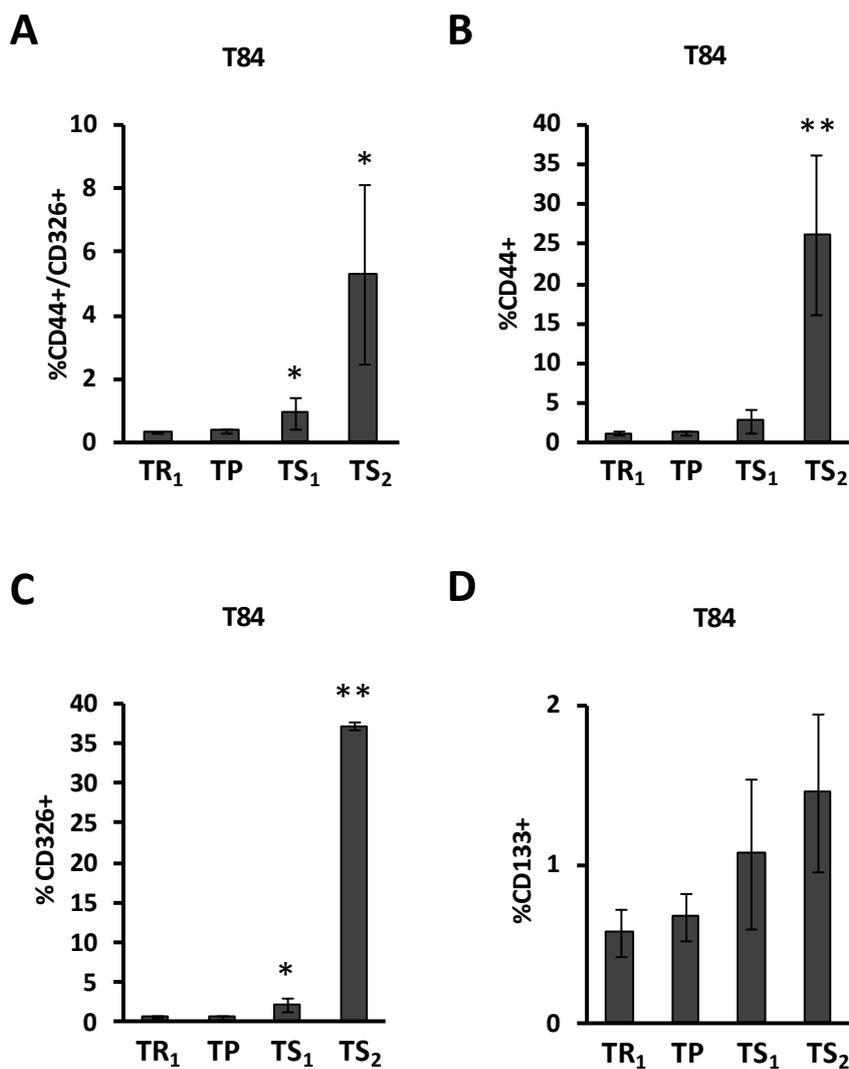


Figura 35. Porcentaje de células con fenotipo (A) CD44⁺/CD326⁺, (B) CD44⁺, (C) CD326⁺ y (D) CD133⁺ de todas las subpoblaciones de las línea T84 respecto a TP.

Datos mostrados como media \pm SD (** p < 0.01; * p < 0.05).

1.3. LAS SUBPOBLACIONES CON MENOR CAPACIDAD DE ADHESIÓN POSEEN UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTORRENOVACIÓN Y MAYOR CLONOGENICIDAD.

Además, comprobamos las características funcionales *in vitro* de las subpoblaciones celulares aisladas por tripsinización diferencial. En primer lugar, estudiamos el crecimiento de las subpoblaciones TS y TR en placas de baja adherencia y medio libre de suero, para determinar su capacidad de autorrenovación, así como su capacidad clonogénica mediante la formación de colonias en agar blando. Como se muestra en la Figura 35, las subpoblaciones TS₁ y TS₂ formaron esferas más eficientemente que TR₁ y TP en todas las líneas celulares, lo que indica que las subpoblaciones TS tienen una mayor capacidad de autorrenovación. Además, la subpoblación TR₁ formó significativamente menos esferas que TP en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y T84 (Figura 36).

Además, las subpoblaciones TS mostraron una mayor capacidad para formar colonias en agar blando que TP para todas las líneas celulares estudiadas, lo que demuestra una mayor clonogenicidad por parte de la subpoblación con menor capacidad de adhesión (Figura 37).

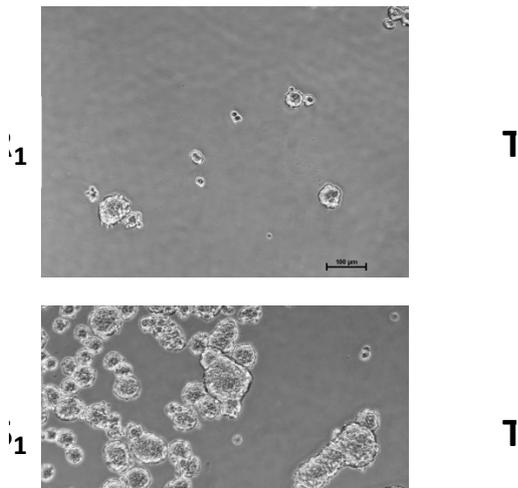
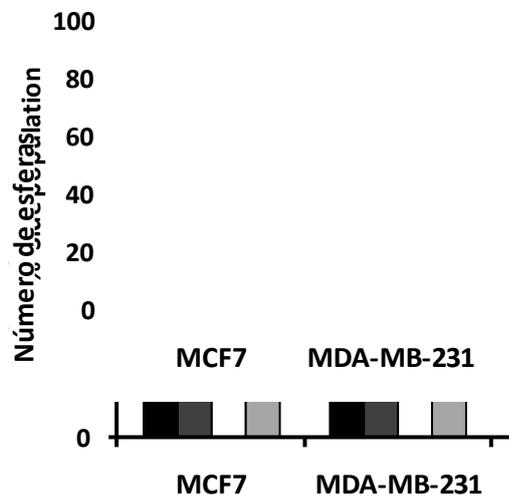


Figura 36. (A) Número de esferas formadas por las diferentes subpoblaciones. Datos mostrados como media \pm SD (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$) **(B)** Imágenes representativas de mammosferas formadas por las diferentes subpoblaciones de la línea MCF7.

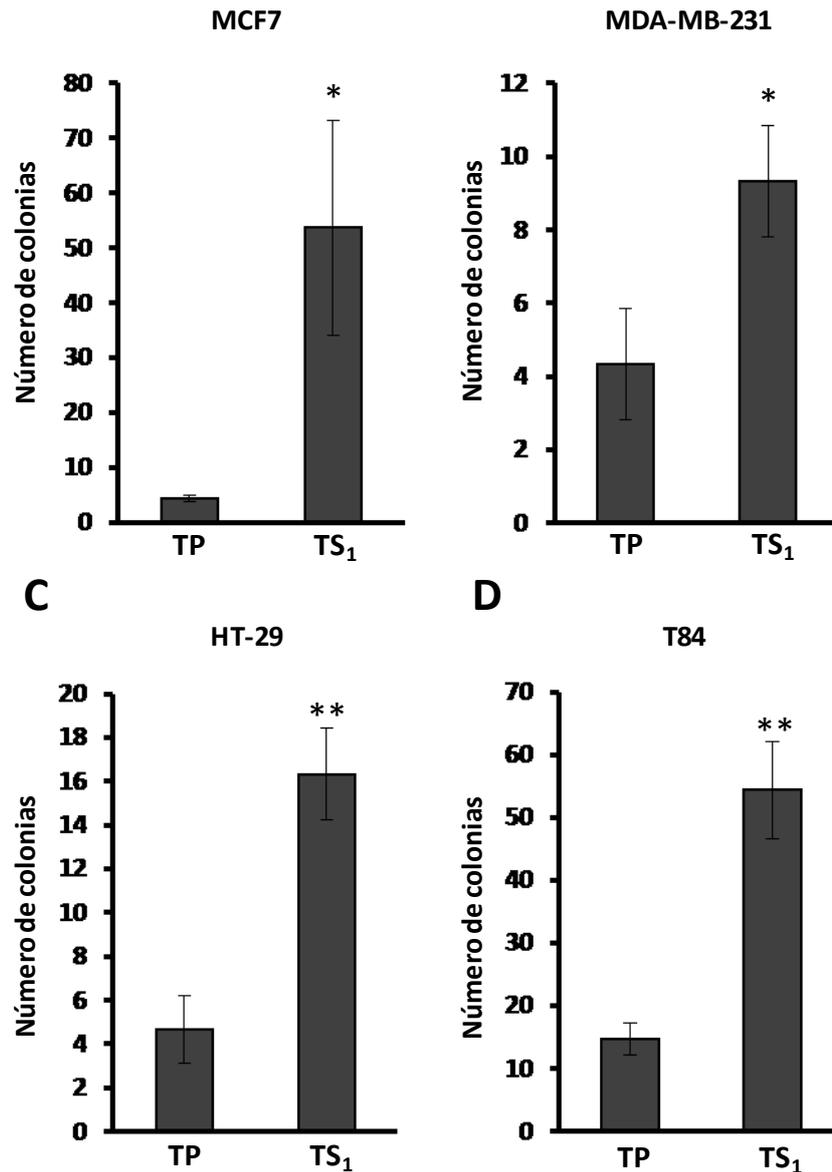


Figura 37. Número de colonias formadas por TP y TS₁ para cada línea celular. Datos mostrados como media ± SD (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

1.4. LAS CÉLULAS RESISTENTES A UNA SEGUNDA TRIPSINIZACIÓN PRESENTAN NIVELES MUY BAJOS DE ACTIVIDAD ALDH

Como se muestra en los resultados previos, obtuvimos una subpoblación enriquecida en células con características de CSCs basándonos en su menor capacidad de adhesión a la superficie de cultivo celular. La cantidad de células despegadas después de la primera tripsinización fue muy baja, y la subpoblación restante de células adheridas era muy similar a TP. Por esta

razón, para demostrar que es posible separar CSCs y células tumorales no *stem*, con una alta pureza, en base a su sensibilidad a la tripsina, desarrollamos otro protocolo. Después de la primera tripsinización, recuperamos, al igual que en el protocolo anterior, la subpoblación TS_1 , enriquecida en características de CSCs como se ha demostrado anteriormente. Las células que permanecían adheridas a la superficie de cultivo fueron lavadas con PBS 2 veces y tripsinizadas de nuevo con la misma dilución de tripsina (0.05%) que en el paso anterior, pero en este caso durante 4 minutos. Las células que se despegaron en esta última tripsinización fueron desechadas. Las células que permanecían pegadas fueron recuperadas y nombrada esta subpoblación como Tripsina-Resistente 2 (TR_2) (Figura 38).

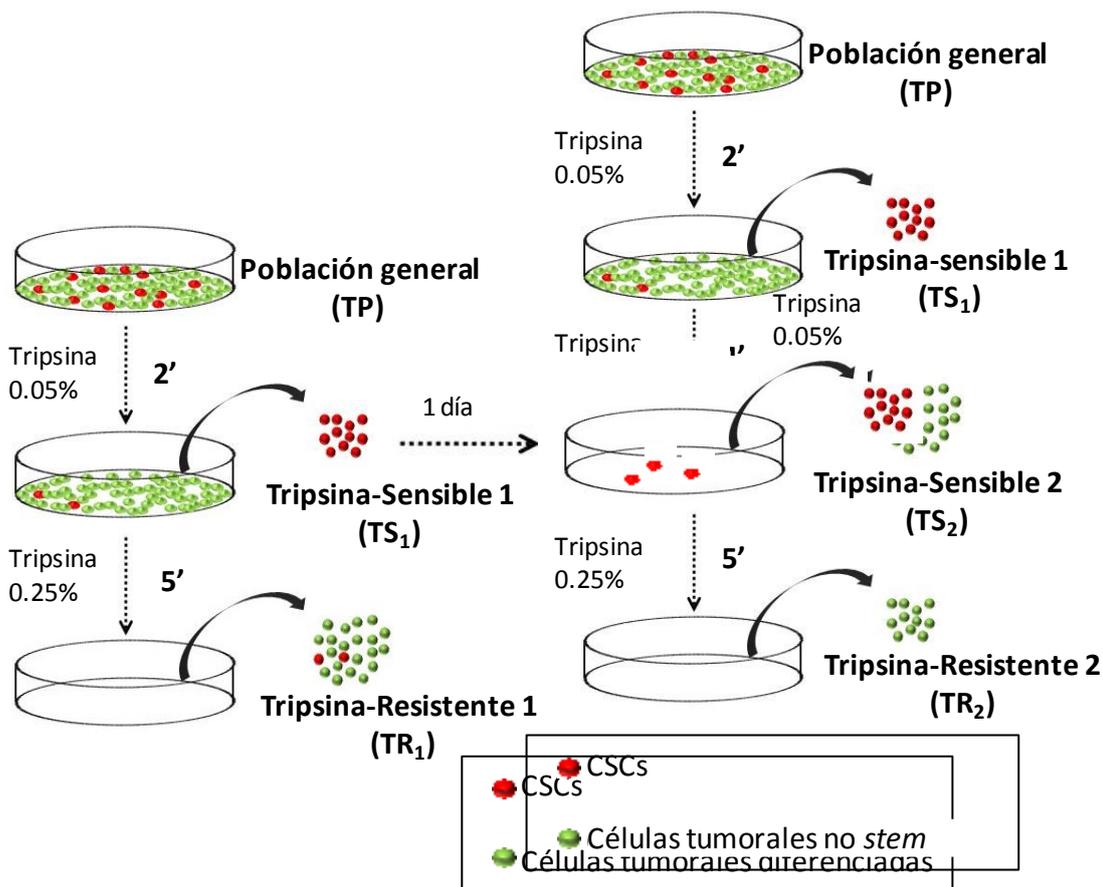


Figura 38. Protocolo de aislamiento de una subpoblación enriquecida en CSCs y una subpoblación enriquecida en células tumorales no *stem* en base a su capacidad de adhesión.

Para evaluar si existía alguna ventaja del último protocolo desarrollado con respecto al inicial, se determinó la actividad ALDH de las subpoblaciones aisladas. Como se muestra en la Figura 38, TP y las subpoblaciones TS₁ y TR₂ difieren en la proporción de células ALDH⁺. En concreto, la subpoblación TS₁ estaba enriquecida en células con una alta actividad ALDH, con un alto grado de pureza, mayor a un 90%, un enriquecimiento muy similar al que se obtiene habitualmente por FACS; mientras que la subpoblación TR₂ mostró una baja actividad ALDH en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 (Figura 39), por lo que se demostró que mediante este protocolo mejorado pueden aislarse células con una muy baja expresión de ALDH.

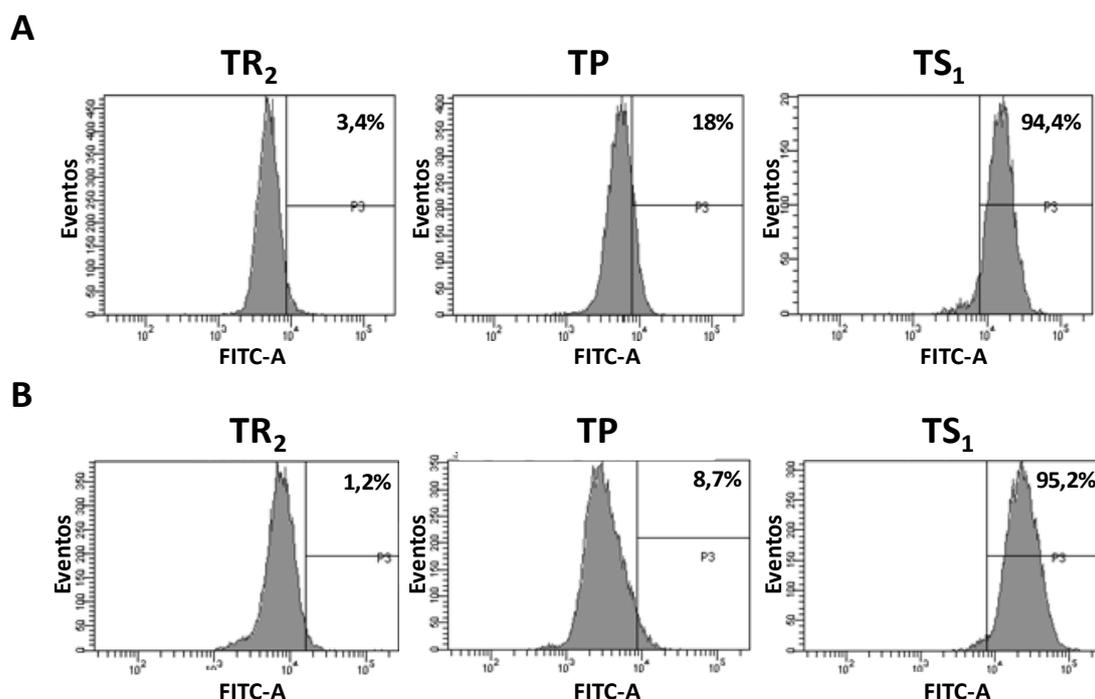


Figura 39. Ensayo de Aldefluor realizado para TR₂, TP y TS₁ para las líneas (A) MDA-MB-231 y (B) MCF7.

1.5. LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS SENSIBLES A LA TRIPSINA EXPRESAN NIVELES MÁS ALTOS DE GENES ASOCIADOS A EMT Y PLURIPOTENCIA

El enriquecimiento de células cancerígenas con propiedades de células madre en células que muestran baja adherencia a la superficie plástica puede

ser debido a un proceso de EMT, el cual está asociado a metástasis. Es por ello que analizamos la expresión de genes relacionados con los procesos de EMT y/o pluripotencia en la línea celular MDA-MB-231.

Los estudios de qRT-PCR demuestran que todos los genes ensayados se expresan diferencialmente en las subpoblaciones celulares TS₁ y TR₂. Los genes *SNAIL*, *SLUG*, vimentina (*VIM*), n-cadherina (*NCAD*), *CXCL10*, *OCT4* y *BMI1* se sobreexpresaron en la subpoblación TS₁ comparada con TP, expresándose en menor medida en la subpoblación TR₂. En contraste, los niveles de expresión de claudina-1 (*CLDN1*) y e-cadherina (*ECAD*) fueron más altos en la subpoblación TR₂ y más bajos en la subpoblación TS₁ (Figura 40).

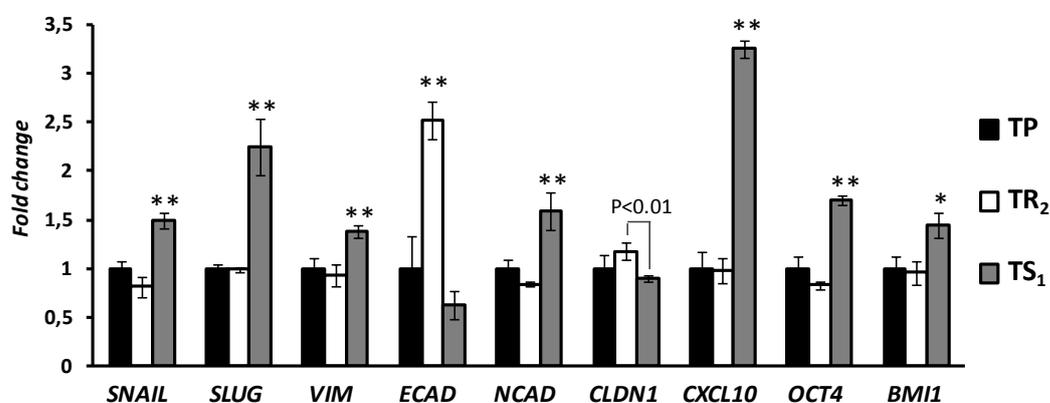


Figura 40. Expresión de genes relacionados con EMT y pluripotencia mediante qRT-PCR en las diferentes subpoblaciones de la línea celular MDA-MB-231. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

1.6. LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS SENSIBLES A LA TRIPSINA ESTÁ ENRIQUECIDA EN CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES

Para confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, las subpoblaciones TS₁ y TR₂ aisladas a partir de la línea MDA-MB-231, fueron inyectadas subcutáneamente en ratones NSG y comparadas con TP. La supervivencia total de ratones inyectados con células TS₁ fue menor que en los otros grupos. Cuando se inyectaron 5×10^3 células de las subpoblaciones TS₁, TP o TR₂, la tasa de supervivencia total de los ratones fue de 63, 77 y 81 días, respectivamente (Figura 41A). Además, el volumen de los tumores formados por TS₁ fue mayor que los formados por TP, mientras que los tumores

formados por TR₂ fueron de menor tamaño (Figura 41B). Resultados similares se obtuvieron cuando se inyectaron 1.5×10^4 células, sin embargo, como era de esperar, la supervivencia total fue más corta y el tamaño del tumor mayor (Figura 41A y C). Estos datos demuestran que la subpoblación TS está enriquecida en CSCs con una alta capacidad de iniciar tumores, mientras que la subpoblación TR está principalmente formada por células más diferenciadas.

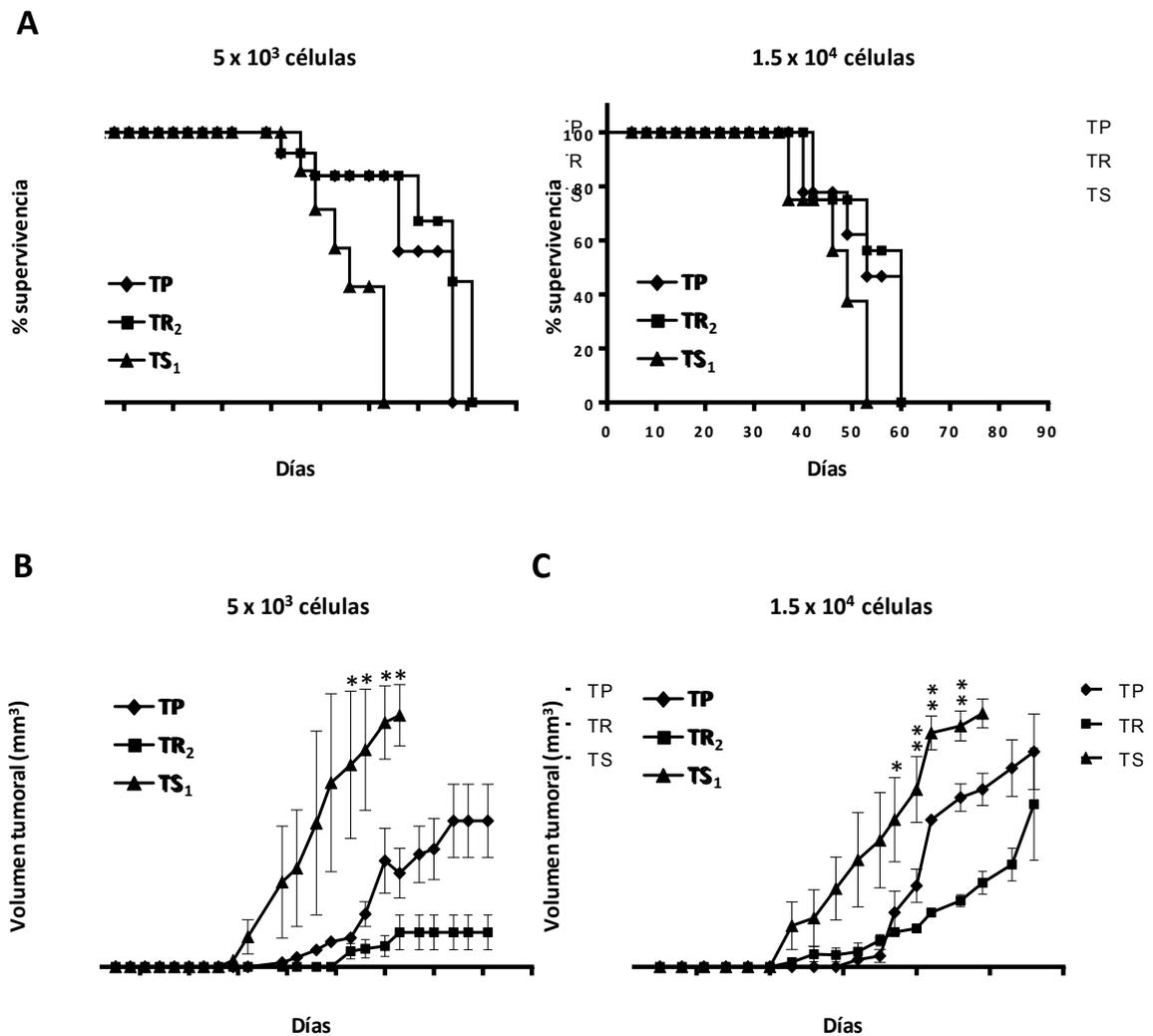


Figura 40. (A) Curva Kaplan-Meier de la supervivencia de ratones NSG inyectados con 5×10^3 (izquierda) y 1.5×10^4 (derecha) células de TR₂, TP o TS₁ de la línea MDA-MB-231. (B, C) Volumen de los tumores subcutáneos (mm³) formados en ratones NSG a partir de (B) 5×10^3 y (C) 1.5×10^4 de células TR₂, TP o TS₁ de la línea MDA-MB-231. Datos mostrados como media \pm SD (** p < 0.01; * p < 0.05).

1.7. LA SUBPOBLACIÓN SENSIBLE A LA TRIPSINA TIENE UN MAYOR POTENCIAL METASTÁSICO

Para demostrar la mayor agresividad de la subpoblación con menor capacidad de adherencia, comparamos la habilidad metastásica de ambas subpoblaciones aisladas por tripsinización diferencial (TS₁ y TR₂) con TP, usando para ello células MDA-MB-231 L2T, las cuales expresan el gen de la luciferasa. Cuando 2.5×10^5 células de la subpoblación TS₁ fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones NSG, 5 de 6 animales desarrollaron metástasis de pulmón, sin embargo cuando se inyectaron TP o TR₂, solo 4 y 2 de 6 animales desarrollaron metástasis, respectivamente (Figura 42A). Además, la subpoblación TS₁ causó un incremento más rápido en la bioluminiscencia del tumor, demostrando su mayor habilidad metastásica (Figura 42B).

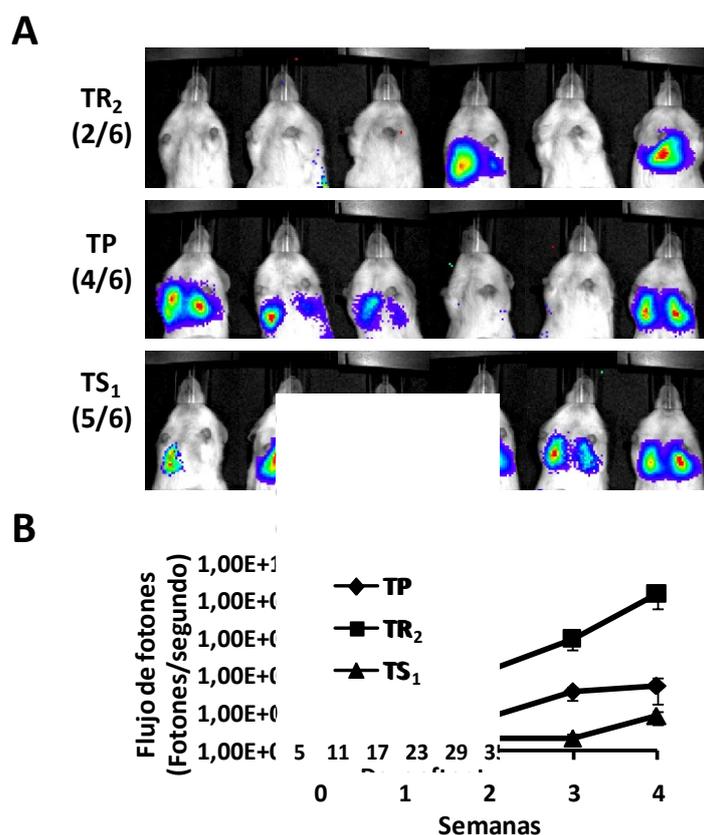


Figura 42. (A) Imágenes y (B) medida del flujo de fotones (fotones por segundo) de las metástasis de pulmón formadas tras la inyección de células de TR₂, TP y TS₁ de la línea MDA-MB-231 L2T en la cola de ratones NSG obtenidas mediante IVIS, en la tercera semana tras la inyección. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Después de 4 semanas, los animales fueron sacrificados y extirpados sus pulmones, observándose que los ratones inyectados con células TS_1 mostraron más metástasis que los inyectados con células TP o TR_2 (Figura 43).

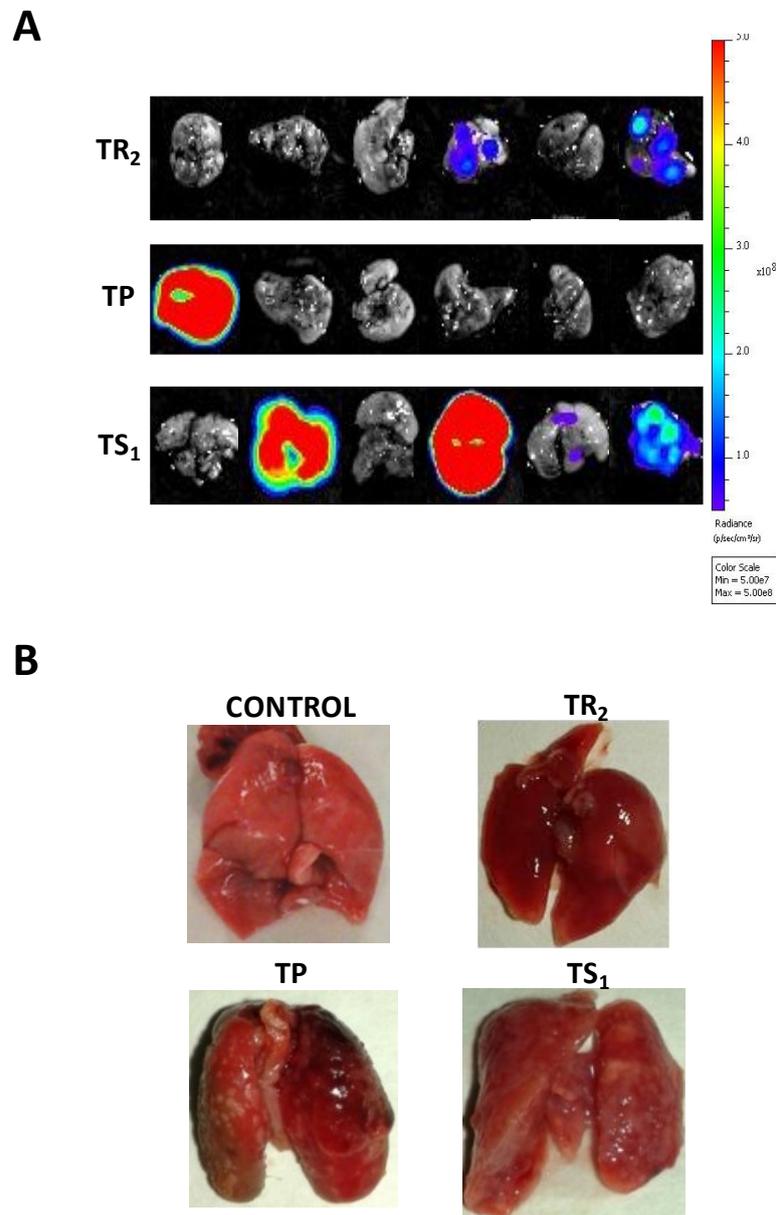


Figura 43. (A) Fluorescencia *ex vivo* de los pulmones metastásicos extirpados de ratones previamente inyectados con células de las subpoblaciones TR_2 y TS_1 , así como con de TP de la línea MDA-MB-231 L2T. (B) Imágenes ópticas *ex vivo* representativas de los pulmones *ex vivo* de un ratón sano (control) junto con los pulmones de ratones previamente inyectados con células de las subpoblaciones TR_2 y TS_1 , así como de TP de la línea MDA-MB-231.

Además, el análisis histológico e inmunohistoquímico de los pulmones demuestra que las metástasis formadas por TS₁ fueron mayores que las formadas por TP, y menores que las formadas por TR₂ (Figura 44). Esto demuestra la mayor habilidad metastásica de la subpoblación TS₁ y las características de células cancerígenas más diferenciadas de la subpoblación TR₂.

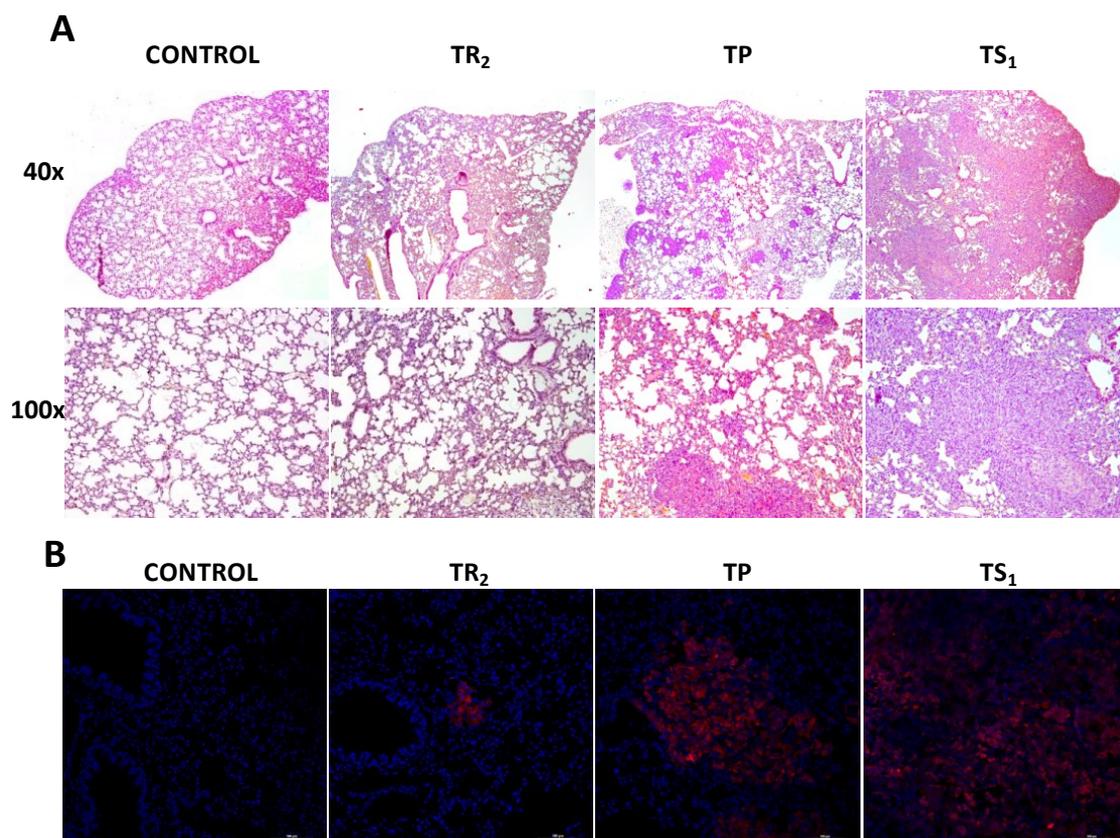


Figura 44. Imágenes (A) histológicas (HE) e (B) inmunohistoquímicas representativas de los pulmones obtenidos a partir de un ratón sano (control) y de ratones inyectados con células TR₂, TP y TS₁ de MDA-MB-231.

2. DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TUMORALES Y LÍNEAS NO TUMORALES

2.1. ELECCIÓN DE LOS MICRORNAS A ESTUDIAR MEDIANTE PREDICCIONES BIOINFORMÁTICAS

En primer lugar realizamos una serie de predicciones bioinformáticas, mediante el uso de los programas TargetScan 6.0, miRanda-mirSVR y PicTar, para la búsqueda de miRs que inhibieran diferentes mRNAs de genes involucrados en las rutas de autorrenovación (Notch, Wnt y Hh) y otras rutas relacionadas con cáncer. De la ruta Notch se realizó la predicción para la inhibición de sus receptores (*NOTCH1-4*) y otras proteínas involucradas en esta ruta como *RBPJ*, *DNER*, *MAML1*, *SNW1* (*SKIP*) y los componentes de la γ -secretasa, nicastrina (*NCSTN*), presenilina (*PSEN1* y *PSEN2*), *APH-1* (*APH1A* y *APH1B*) y *PSENEN* (*PEN-2*). De la ruta Wnt se realizaron las predicciones frente a sus receptores (*FZD 1-10*), así como a *CTNNB1* (β -catenina), *WLS* y los reguladores negativos *AXIN1/2*, *APC* y *GSK3B*. De la ruta Hh fueron utilizados en la predicción su receptor (*PTCH1/2*), *SMO*, *GLI1*, *GLI3* y *BMI1*. Otros genes estudiados en la predicción fueron *CDKN1A* (*P21*), *MYC* y *ABCB5*. Para realizar la selección nos basamos en los valores obtenidos de *context+ score* en TargetScan 6.0 y *mirSVR score* en miRanda-mirSVR, siendo en ambos casos los más favorables aquellos que tienen un valor menor en el análisis. También utilizamos la probabilidad dada por PicTar, siendo más favorable cuanto mayor es su valor. En la Tabla 6 se muestran los miRs seleccionados junto a sus posibles dianas. Además, se utilizó hsa-miR-21-5p como control positivo de subpoblaciones enriquecidas en CSCs. En la sección *Predicciones bioinformáticas de los microRNAs seleccionados*, se muestra con más detalle las imágenes obtenidas en las predicciones realizadas.

Tabla 6. miRs seleccionados y sus posibles dianas.

Dianas	miRs	TargetScan 6.0 (Context+ score)	miRanda-mirSVR (mirSVR score)	PicTar (probabilidad)
NOTCH1	hsa-miR-34a	-0.34	-1.2401	0.94
	hsa-miR-34c	-0.33	-1.2426	0.94
NOTCH2	hsa-miR-15b	-0.24	----	----
	hsa-miR-34a	-0.13	----	0.87
APH1B	hsa-miR-34c	-0.12	----	0.89
	hsa-miR-590	----	-0.7131	----
MAML1	hsa-miR-93	----	----	0.82
	hsa-miR-590	-0.22	-0.9176	----
RBPJ	hsa-miR-15b	----	-0.9352	----
	hsa-miR-199a	-0.34	-0.4930	0.85
FZD4	hsa-miR-100	-0.30	----	----
FZD5	hsa-miR-199a	-0.43	-1.0331	0.97
FZD6	hsa-miR-100	-0.34	-1.1406	0.92
FZD8	hsa-miR-15b	-0.51	-1.3160	0.95
FZD10	hsa-miR-15b	-0.23	-0.8583	0.98
AXIN	hsa-miR-199a	-0.20/-0.09	----	0.99
GSK3B	hsa-miR-142	-0.40	-1.2461	----
APC	hsa-miR-15b	-0.24	-0.5850	----
PTCH1	hsa-miR-370	-0.33/-0.26	-0.2491	----
SMO	hsa-miR-93	----	-0.6463	0.93
CDKN1A	hsa-miR-15b	----	-1.2476	----
ABCB5				

2.2. ESTUDIO DEL CORRECTO USO DE NORMALIZADORES PARA EL ANÁLISIS DE MICRORNAS MEDIANTE qRT-PCR RELATIVA

Los miRs seleccionados anteriormente mediante predicciones bioinformáticas, fueron validados tanto en subpoblaciones enriquecidas en CSCs y en células tumorales no *stem*, como en líneas tumorales y no tumorales de colon mediante qRT-PCR. Para ello, en primer lugar analizamos si alguno de los normalizadores comúnmente utilizados en estudios de qRT-PCR para miRs era útil en nuestro estudio en concreto. Dicho estudio se llevó a cabo en células aisladas en base a su actividad ALDH mediante FACS o mediante tripsinización diferencial. Para la normalización de los datos se utilizó *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*, utilizado como control de la retrotranscripción.

Uno de los normalizadores analizados fue U6, comúnmente utilizado en estudios de miRs, el cual mostró una expresión significativamente mayor en células ALDH⁺ en las líneas HCT 116 (Figura 45A), HT-29 (Figura 45B) y A-375 (Figura 45C) respecto a la subpoblación ALDH⁻, así como en la subpoblación TS₁ de la línea celular MDA-MB-231 respecto a las células TR₂ (Figura 45D).

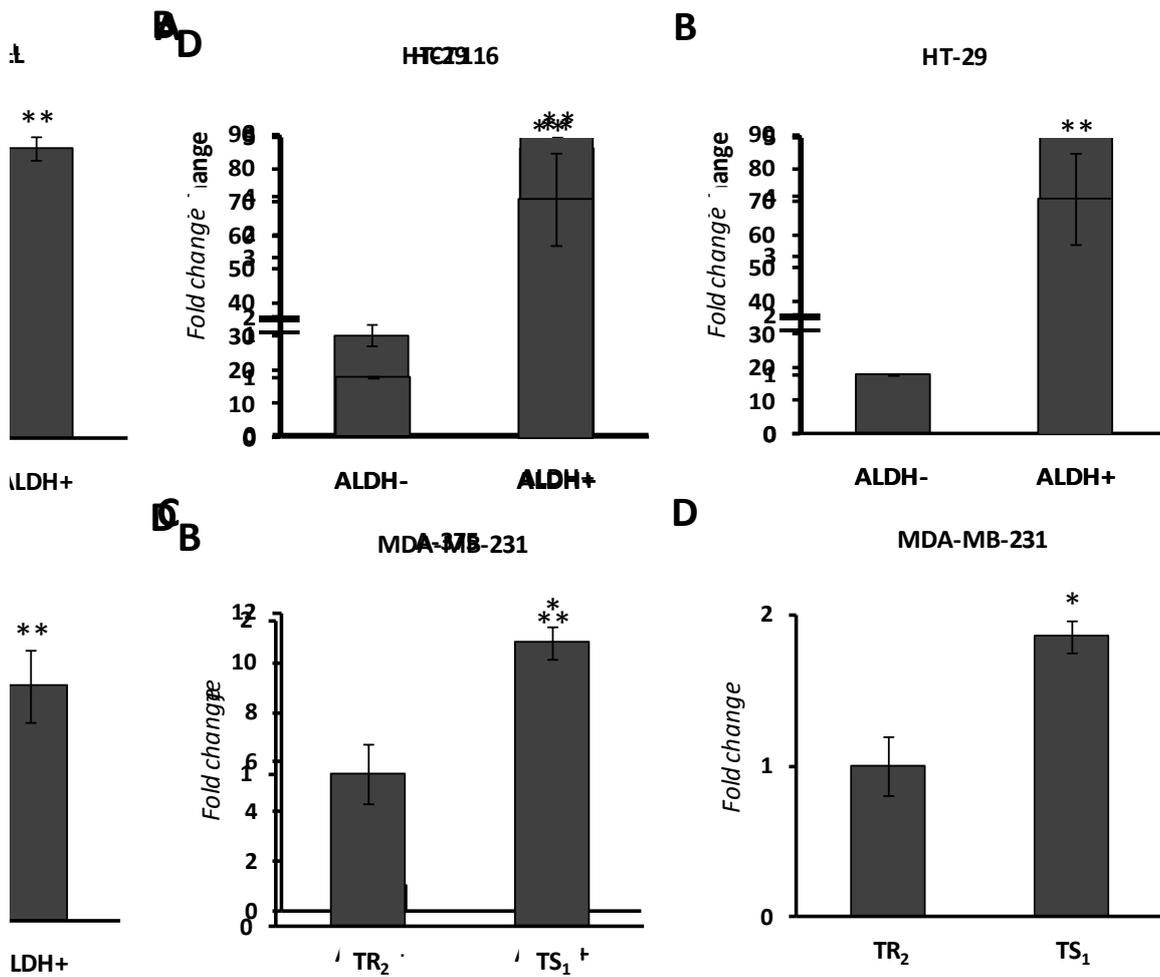


Figura 45. Cambios en la expresión (*Fold change*) de U6 en las líneas (A) HCT 116, (B) HT-29 y (C) A-375 aisladas en base a su actividad ALDH mediante FACS, y (D) en las subpoblaciones aisladas en base a su capacidad de adhesión de la línea MDA-MB-231. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** p < 0.01; * p < 0.05).

Al igual que en el caso anterior, otro normalizador frecuentemente utilizado como el rRNA 5S también mostró una mayor expresión en las células positivas para Aldefluor (Figura 46).

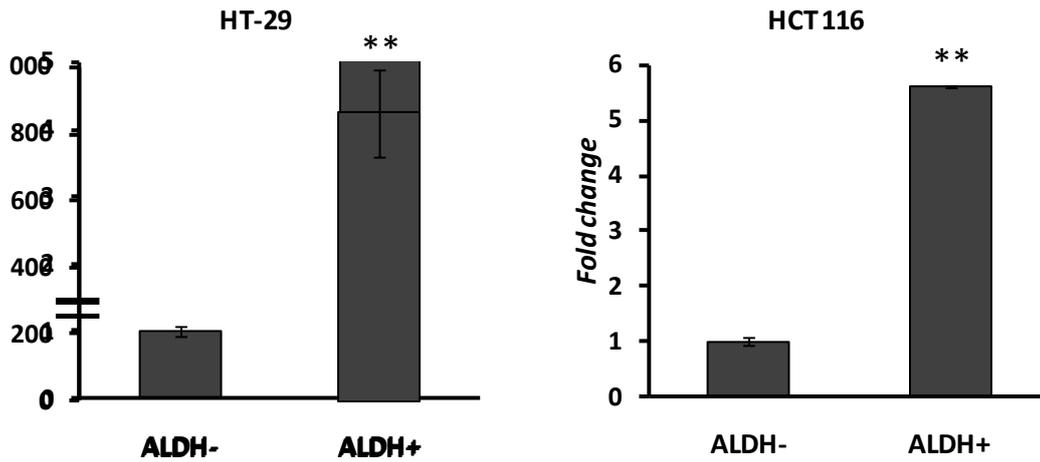


Figura 46. Cambios en la expresión (*Fold change*) de rRNA 5S en las subpoblaciones aisladas en base a su actividad ALDH mediante FACS de las líneas (A) HT-29 y (B) HCT 116. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Al igual que en los casos anteriores SNORD44 varió significativamente en las subpoblaciones de las líneas HT-29 (Figura 47A) y HCT 116 (Figura 47B) aisladas según su actividad ALDH, así como en las subpoblaciones de MDA-MB-231 obtenidas en base a su capacidad de adhesión (Figura 47C), siendo siempre la expresión relativamente mayor en las subpoblaciones enriquecidas en células con propiedades de CSCs respecto a las subpoblaciones de células no *stem*.

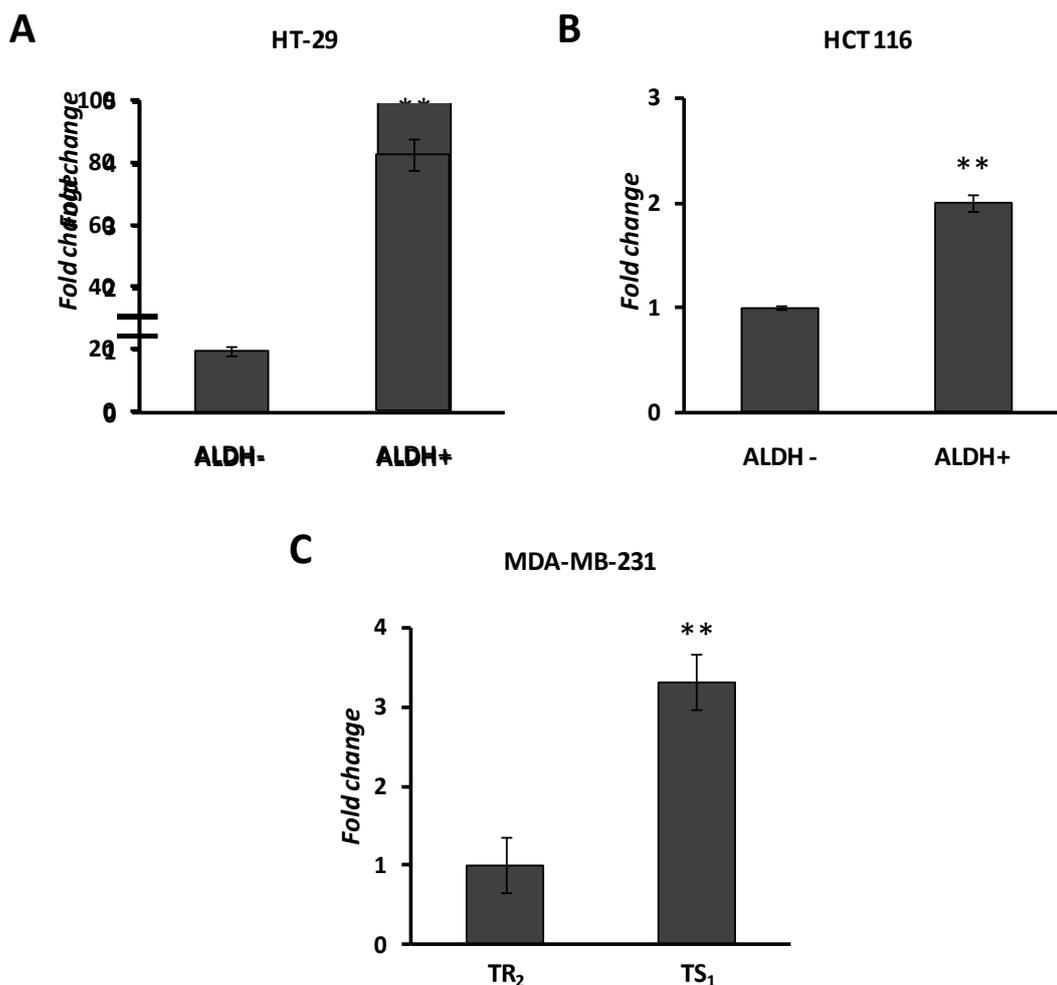


Figura 47. Cambios en la expresión (*Fold change*) de SNORD44 en las subpoblaciones de las líneas **(A)** HT-29, **(B)** HCT 116 aisladas en base a su actividad ALDH mediante FACS y **(C)** en las subpoblaciones aisladas en base a su capacidad de adhesión de la línea MDA-MB-231. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Posteriormente, para corroborar estos resultados realizamos un estudio de la estabilidad en la expresión entre las muestras de estos posibles normalizadores mediante las aplicaciones Bestkeeper, NormFinder y el método comparativo Δ Ct en la línea HT-29, HCT 116 y MDA-MB-231, a través de la obtención de valores de desviación entre muestras dado por Bestkeeper, el valor de estabilidad dado por NormFinder y la variación de Ct entre pares de genes estudiados en las diferentes muestras, mostrando en todos los casos mayor estabilidad cuanto menor es el valor de estos datos.

Al igual que en nuestros resultados anteriores U6, rRNA 5S y SNORD44 mostraron una baja estabilidad en las subpoblaciones aisladas en base a su actividad ALDH de la línea HT-29 (Figura 48).

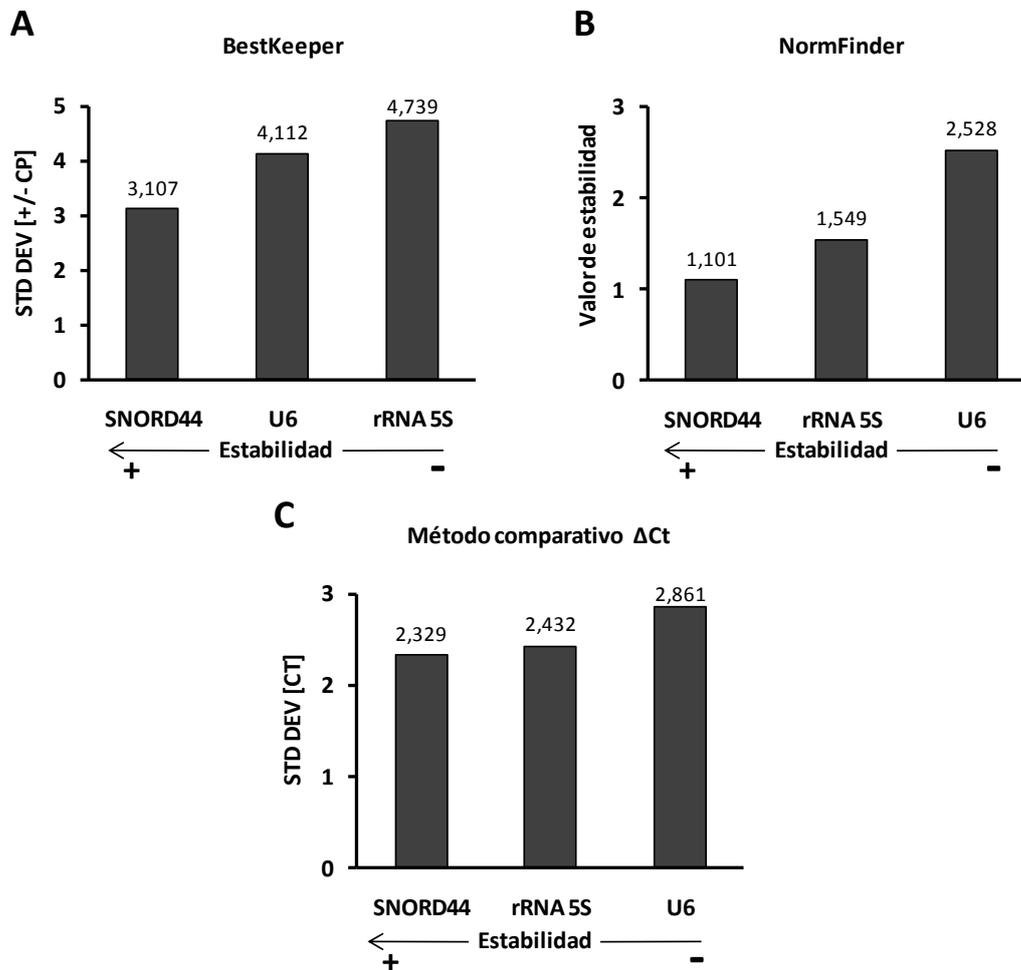


Figura 48. Estudio de la estabilidad de normalizadores potenciales en subpoblaciones ALDH⁺ y ALDH⁻ de la línea HT-29 mediante (A) Bestkeeper, (B) NormFinder y (C) Método comparativo Δ Ct.

Al igual que en la línea HT-29, en las subpoblaciones ALDH⁻ y ALDH⁺ de la línea HCT 116 los normalizadores estudiados tampoco mostraron una expresión estable adecuada para ser usados como normalizadores (Figura 49).

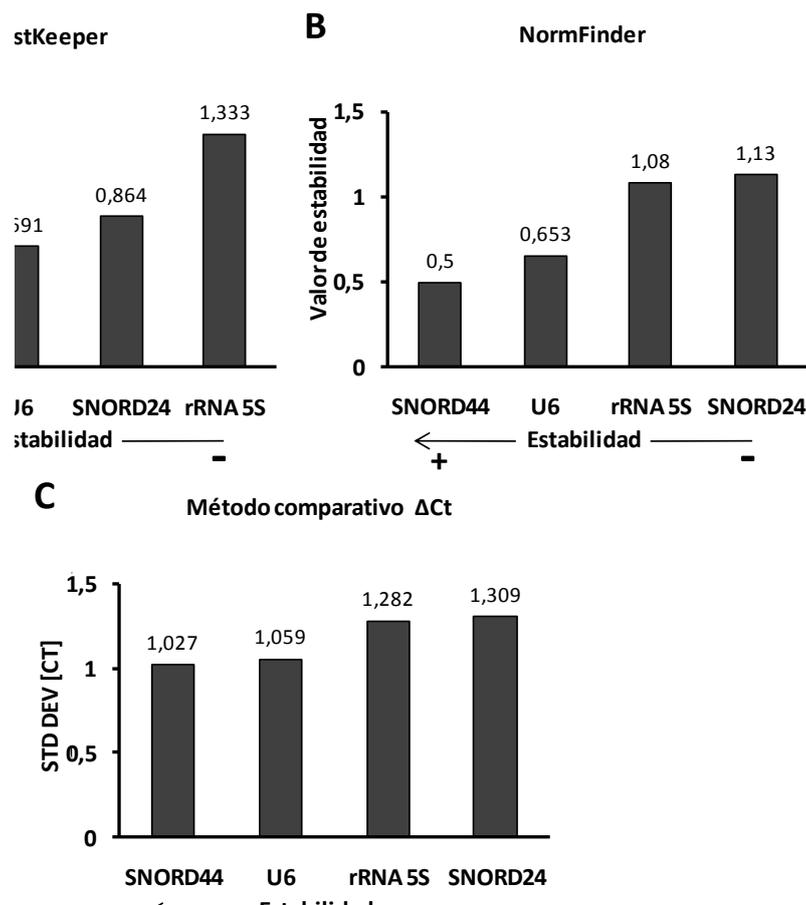


Figura 49. Estudio de la estabilidad de normalizadores potenciales en las subpoblaciones ALDH⁺ y ALDH⁻ de la línea HCT 116 mediante (A) Bestkeeper, (B) NormFinder y (C) Método comparativo ΔCt .

Este estudio fue también realizado con los datos obtenidos mediante qRT-PCR en las subpoblaciones de MDA-MB-231 aisladas mediante tripsinización diferencial, tanto con los genes inicialmente considerados normalizadores potenciales como con los miRs cuya expresión queríamos estudiar en las diferentes subpoblaciones. Como en los casos anteriores tanto U6 como SNORD44 mostraron una baja estabilidad, no siendo adecuados como normalizadores. Sin embargo, uno de los miRs objeto de estudio, miR-24c-5p mostró una alta estabilidad (Figura 50).

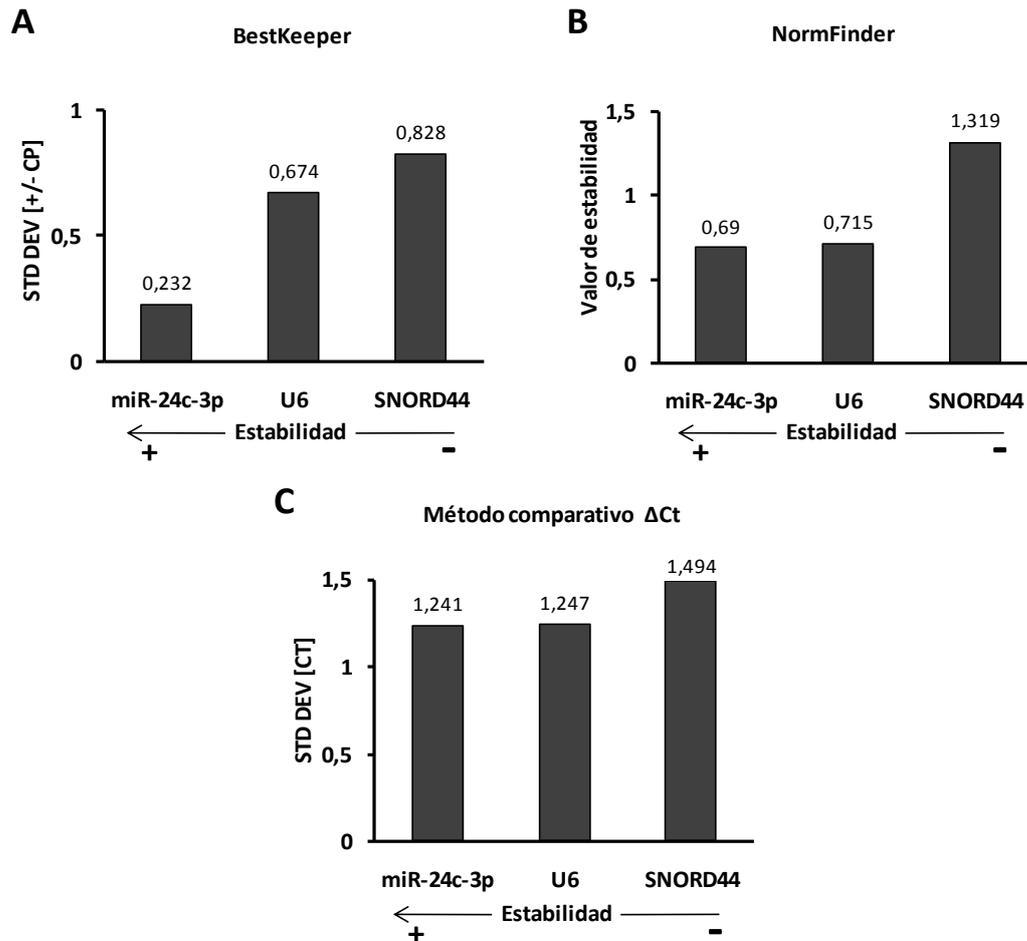


Figura 50. Estudio de la estabilidad de normalizadores potenciales en subpoblaciones aisladas en base a su capacidad de adhesión de la línea MDA-MB-231 mediante (A) Bestkeeper, (B) NormFinder y (C) Método comparativo ΔC_t .

Por esta razón, la expresión de miR-24c-3p fue analizada en base a *UniSp6 RNA Spike-in control primer set* en las diferentes subpoblaciones de MDA-MB-231, observándose que no había diferencias significativas en la expresión de este miR entre las diferentes subpoblaciones (Figura 51). Este resultado nos permitió seleccionarlo como normalizador para posteriores estudios.

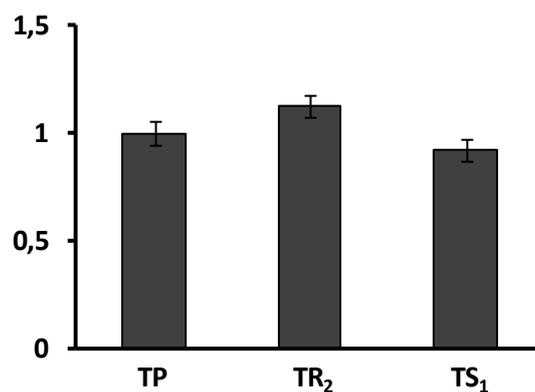


Figura 51. Cambios en la expresión (*Fold change*) de miR-24c-3p en las subpoblaciones de la línea MDA-MB-231 aisladas en base a su capacidad de adhesión respecto a TP. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$).

A continuación, realizamos el estudio de los normalizadores analizados anteriormente, esta vez, entre diferentes líneas tumorales y no tumorales. En primer lugar, evaluamos la validez en la utilización de U6 para normalizar miRs entre la línea tumoral de colon HCT 116 y la línea de colon no tumoral CCD-18Co, siendo la expresión de este ARN más elevada en la línea tumoral (Figura 52).

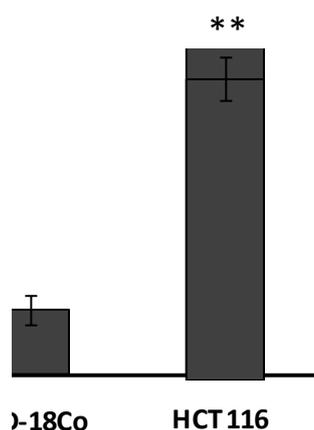


Figura 52. Cambios en la expresión (*Fold change*) de U6 en la línea tumoral de colon HCT 116 y la línea no tumoral de colon CCD-18Co. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Además, analizamos la expresión de otros normalizadores como el rRNA 5s, SNORD24 y SNORD44 en dos líneas tumorales de colon (HCT 116 y HT-29) y en la línea de colon normal (CCD-18Co). Como muestra la Figura 52 tanto el rRNA 5s como el SNORD24 se expresaron diferencialmente en todas las líneas, siendo significativamente mayor su expresión en las dos líneas tumorales. Por otra parte la expresión de SNORD44 fue similar en todas las líneas (Figura 53).

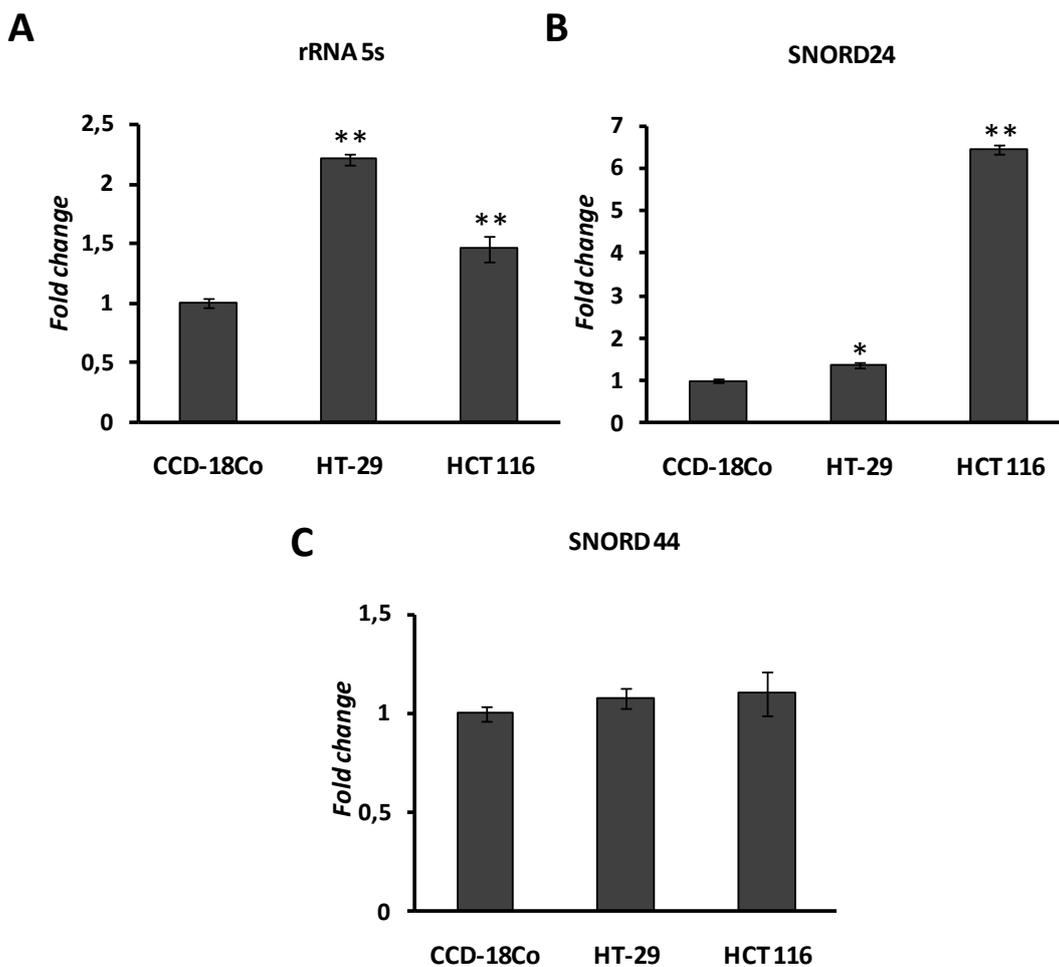


Figura 53. Cambios en la expresión (*Fold change*) de rRNA 5S, SNORD24 y SNORD44 en las líneas tumorales de colon HCT 116 y HT-29 y en la línea no tumoral de colon CCD-18Co. La normalización ha sido realizada mediante *UniSp6 RNA Spike-in control primer set*. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

El análisis de la estabilidad en la expresión de estos ARNs fue evaluada mediante Bestkeeper, NormFinder y el método comparativo Δ Ct, corroborando los anteriores resultados (Figura 54), por lo que SNORD44 fue

utilizado para el posterior análisis de expresión diferencial de miRs entre estas líneas.

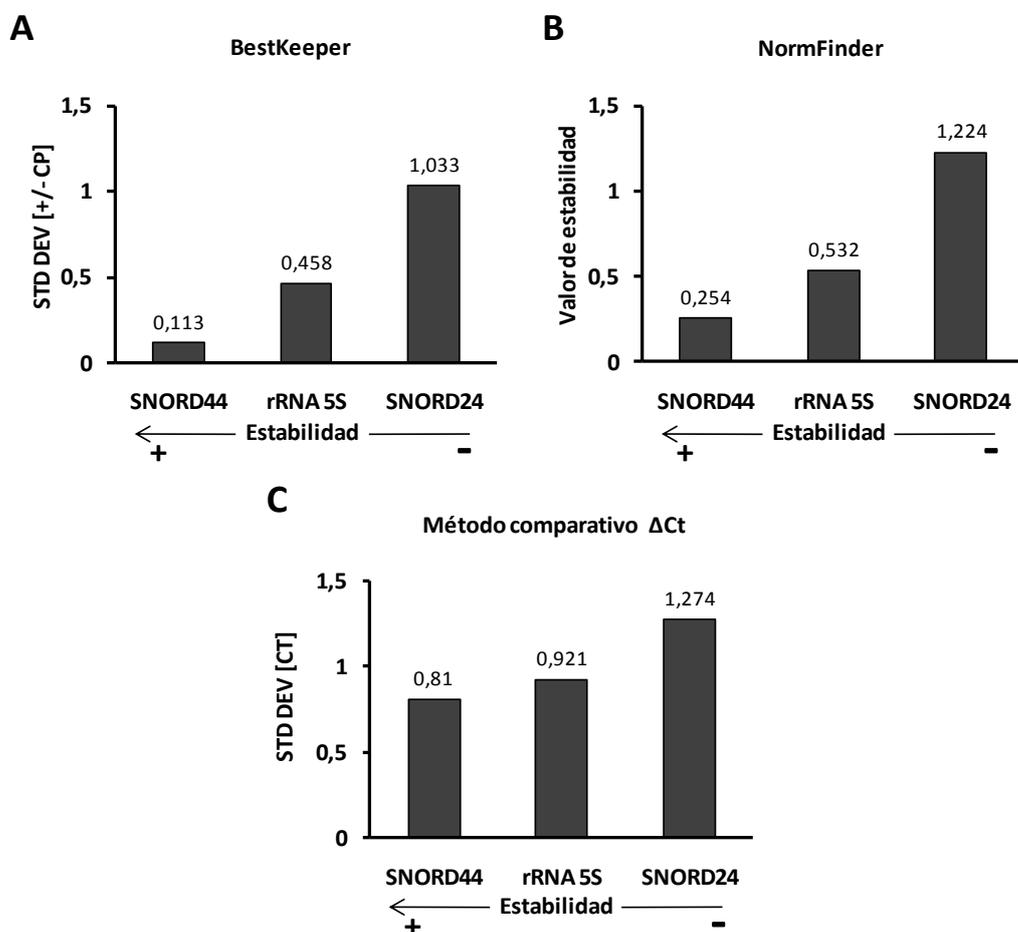


Figura 54. Estudio de la estabilidad de normalizadores potenciales en las líneas HT-29, HCT 116 Y CCD-18Co mediante **(A)** Bestkeeper, **(B)** NormFinder y **(C)** Método comparativo ΔC_t .

Este estudio sobre algunos de los normalizadores utilizados habitualmente en qRT-PCR para miRs refleja que para un correcto análisis de la expresión de diferentes miRs es necesario, la búsqueda de uno o varios normalizadores adecuados para cada tipo de análisis y tipos celulares.

2.3. PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN DIFERENTES TIPOS Y SUBPOBLACIONES DE LÍNEAS CELULARES

En primer lugar, analizamos la expresión diferencial de los miRs previamente seleccionados en las subpoblaciones aisladas en base a su capacidad de adhesión de la línea MDA-MB-231 y las comparamos con la expresión de estos miRs en TP. Como se muestra en la Figura 54 la subpoblación TR₂ mostró un incremento significativo en los niveles de expresión de miR-93-5p, miR-34a-5p, miR-100-5p y miR-34c-5p. Estos miRs tenían una menor expresión en la subpoblación TS₁, aunque no todos ellos mostraron cambios estadísticamente significativos cuando se comparaban con TP. En contraste a esto, la expresión de miR-21-5p fue mayor en TS₁ y menor en TR₂ cuando se compararon con respecto a TP (Figura 55).

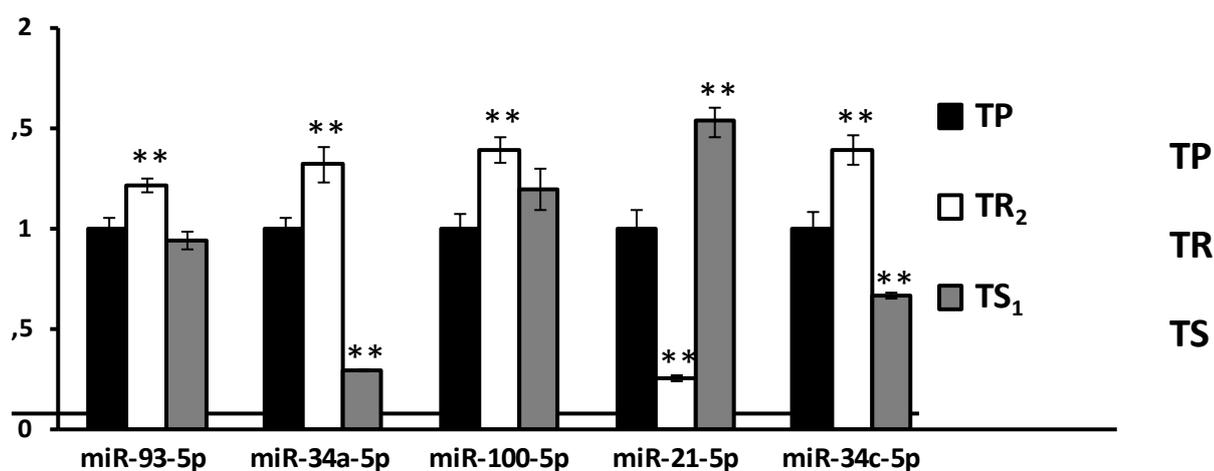


Figura 55. Cambios en la expresión (*Fold change*) de miRs en las subpoblaciones de MDA-MB-231 obtenidas mediante tripsinización diferencial en referencia a TP. miR-24c-3p ha sido utilizado como normalizador. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Por otra parte, analizamos los patrones de expresión de miRs en dos líneas tumorales de cáncer de colon (HT-29 y HCT 116), y en la línea de colon normal CCD-18Co. Como se observa en la Figura 55, las dos líneas tumorales mostraron una significativa mayor expresión de miR-142-3p. En cuanto a miR-590-5p y miR-15b-5p solo se sobreexpresó en la línea HT-29, mientras en la

línea HCT 116 no aparecieron cambios significativos. Además, se observó una drástica disminución en los niveles de expresión de miR-199a-5p y miR-370 en las dos líneas tumorales en comparación con los niveles de expresión en la línea CCD18-Co (Figura 56).

Figura 56. Cambios en la expresión (*Fold change*) de miRs de las líneas HT-29 y HCT 116 en comparación con la línea CCD-18Co. SNORD44 se utilizó para la normalización. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Estos resultados indican que estos miRs son expresados diferencialmente en estas líneas celulares, por lo que podrían ser útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o respuesta a tratamiento en pacientes con cáncer de colon.

3. USO DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILENO COMO VEHÍCULOS DE ANTI-MICRORNAs CON POTENCIAL TERAPÉUTICO

3.1. EFECTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRE LA CÉLULA

En una primera aproximación decidimos comprobar si las NPs en su estado más básico tenían algún efecto *per se* en las líneas celulares donde se iban a ensayar más adelante asociadas a anti-miRs. Para ello, se evaluó la

actividad ALDH, marcadores específicos de CSCs de melanoma, ciclo celular, apoptosis y expresión de miR-21-5p en presencia o ausencia de las NPs en la línea de melanoma metastásico G-361. Para ello, incubamos las células de esta línea celular con 6.5×10^3 NPs/célula durante 8 horas, dejando estas células en cultivo sin NPs posteriormente 72 horas más. Como se observa en la Figura 57, la incubación con NPs no provocó un cambio significativo en el porcentaje de células ALDH⁺ (Figura 57).

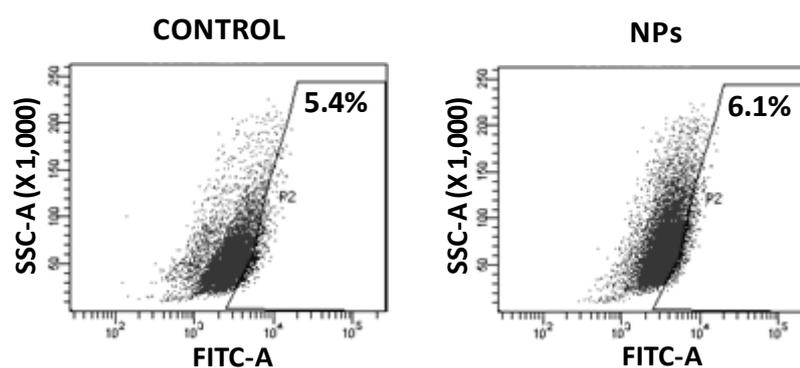


Figura 57. Dot-plot representativo del porcentaje de células ALDH⁺ de la línea G-361 control (izquierda) e incubadas con 6.5×10^3 NPs/célula durante 8 horas (derecha).

Además, la entrada de las NPs tampoco provocó ningún efecto sobre la expresión de marcadores superficiales, apoptosis o ciclo celular (Figura 58). Del mismo modo, no encontramos modificaciones en los niveles de expresión de miR-21-5p (Figura 59), en las células incubadas con NPs con respecto a las células control. Por tanto, nuestros resultados indican que dichas NPs no modifican el estado fisiológico de las células y, por ello, se utilizaron en los estudios posteriores de vehiculización de anti-miR-21-5p en células ALDH⁺ de la línea G-361.

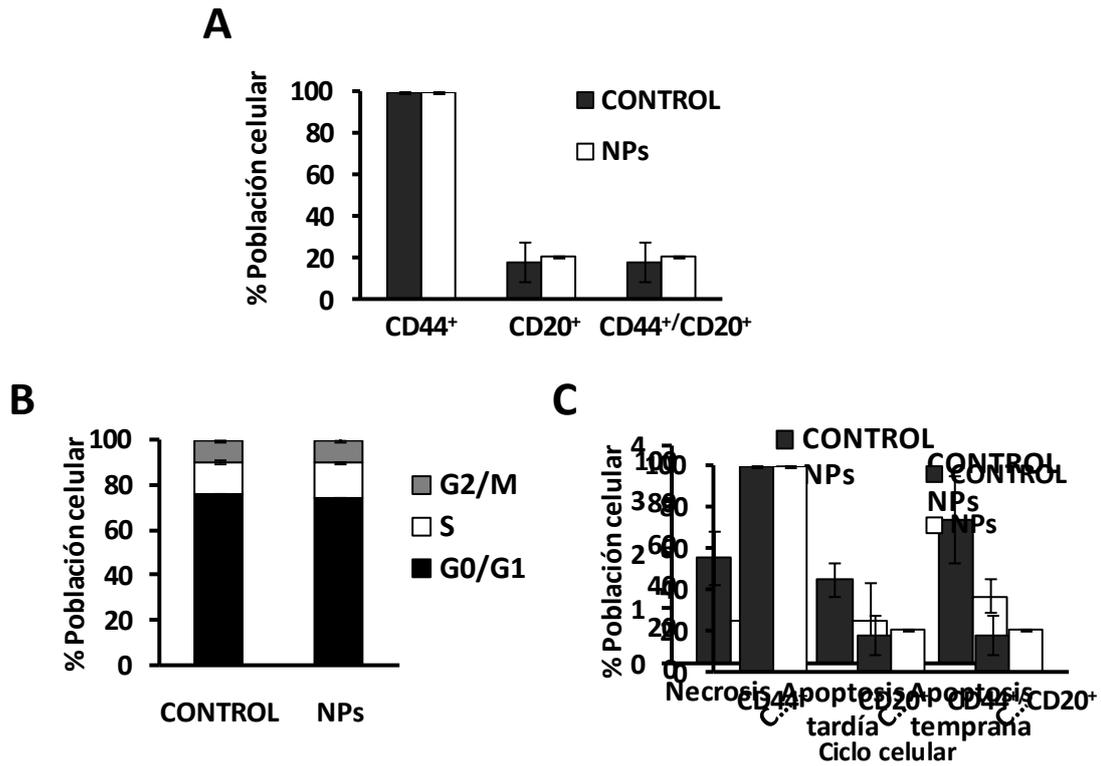


Figura 58. Análisis de (A) la expresión de marcadores superficiales, (B) ciclo celular y (C) apoptosis y necrosis en células control y células incubadas con NPs de la línea G-361. Datos mostrados como media \pm SD (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

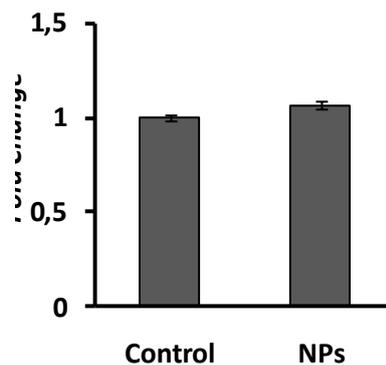


Figura 59. Cambio en la expresión (*Fold change*) de miR-21-5p en la línea G-361 incubada con 6.5×10^3 NPs durante 8 horas en comparación a las células G-361 control. SNORD44 ha sido utilizado para la normalización. Datos mostrados como media \pm SEM (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

3.2. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE ENTRADA DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA SUBPOBLACIÓN ALDH⁺ DE MELANOMA

Una vez demostrado que las NPs no ejercían ningún efecto por si solas sobre las propiedades de la línea celular G-361, comprobamos la eficiencia de entrada en la subpoblación ALDH⁺ de dicha línea celular, de dos NPs marcadas con el fluoroforo Cy5, para poder monitorizar la eficiencia de entrada celular, y con dos grupos funcionales distintos en su extremo terminal: amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH). La influencia del tiempo de incubación, del número de NPs añadidas por célula y de la naturaleza de la NP fue analizada en células ALDH⁺ de la línea G-361 aisladas por FACS. Estos estudios nos permitirán establecer las condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración para llevar a cabo el transporte del cargo bioactivo, ya que nuestro objetivo final es comprobar la capacidad del anti-miR-21-5p vehiculizado por NPs de inhibir el miR-21-5p de las subpoblaciones ALDH⁺ como posible diana terapéutica.

Como se muestra en la Figura 60 la internalización de las NPs amino funcionalizadas (VCC 506.4) fue mayor y más rápida que la de las NPs carboxiladas (VCC 506.3) (Figura 60A), casi del 100% en el menor tiempo de incubación (Figura 60B). La diferencia de entrada celular en función del grupo funcional terminal de las NPs corrobora resultados obtenidos en estudios previos realizados con este tipo de NPs siendo la presencia de grupos amino favorecedora de la entrada celular y obteniendo el efecto contrario en el caso de grupos carboxilo terminal en las NPs.

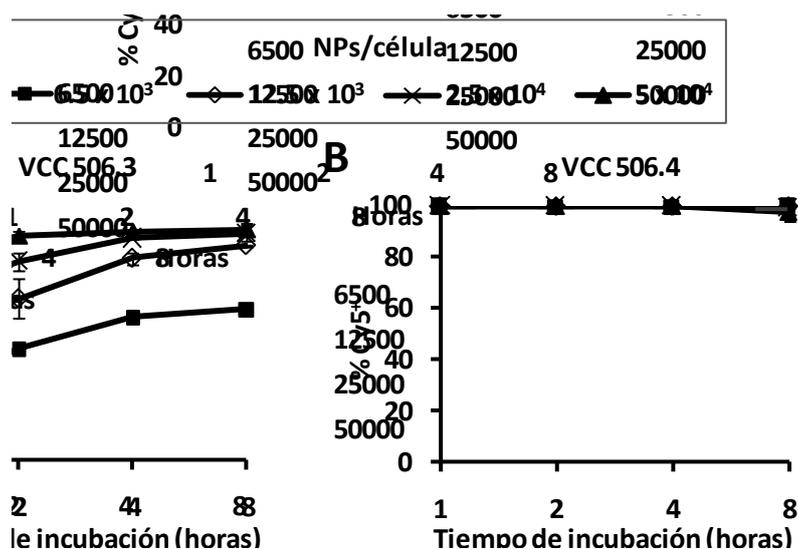


Figura 60. Porcentaje de células positivas para Cy5 incubadas a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de NPs (A) VCC 506.3 y (B) VCC 506.4.

En las siguientes figuras se muestran imágenes de dot-plot representativas de los cambios en la fluorescencia de las células debido a la entrada de NPs-COOH (VCC 506.3) (Figura 61) y NPs-NH₂ (VCC 506.4) (Figura 62) marcadas con Cy5. Además, se puede observar como aumenta la complejidad de las células a medida que aumenta la cantidad de NPs con las que son incubadas, especialmente cuando estas son incubadas con VCC506.4, lo cual demuestra también la alta eficiencia en la entrada de estas NPs. De los resultados obtenidos en este apartado, se eligen como condiciones óptimas para evaluar la entrada celular de las NPs unidas a anti-miR-21-5p, 12.5x10³ NPs por célula y un tiempo de incubación de 4 horas.

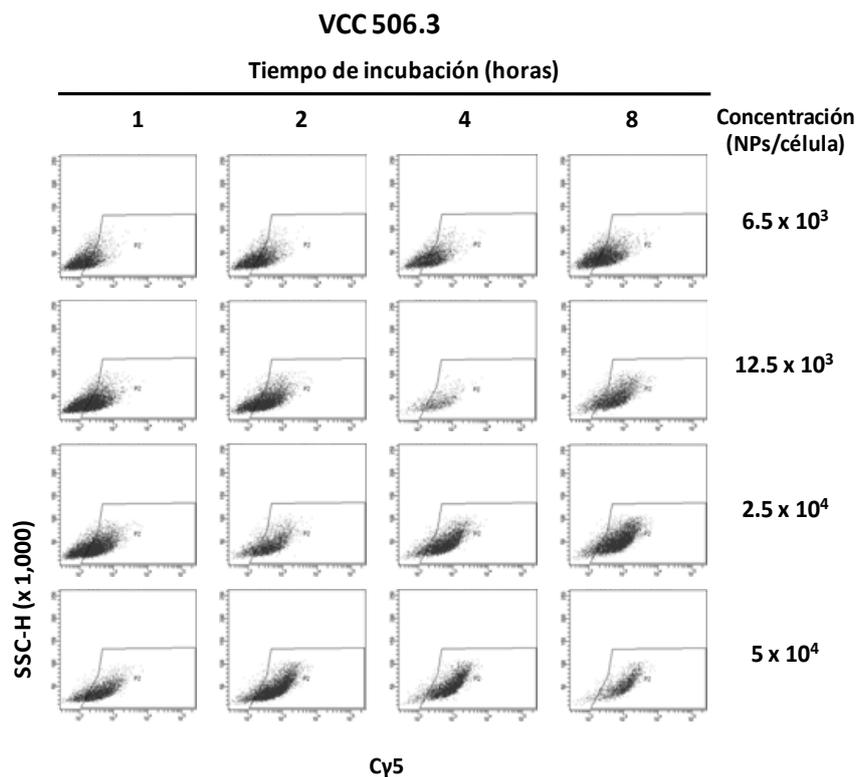


Figura 61. Dot-plot representativo de las células fluorescentes para Cy5 incubadas con VCC 506.3 a diferentes concentraciones y diferentes tiempos.

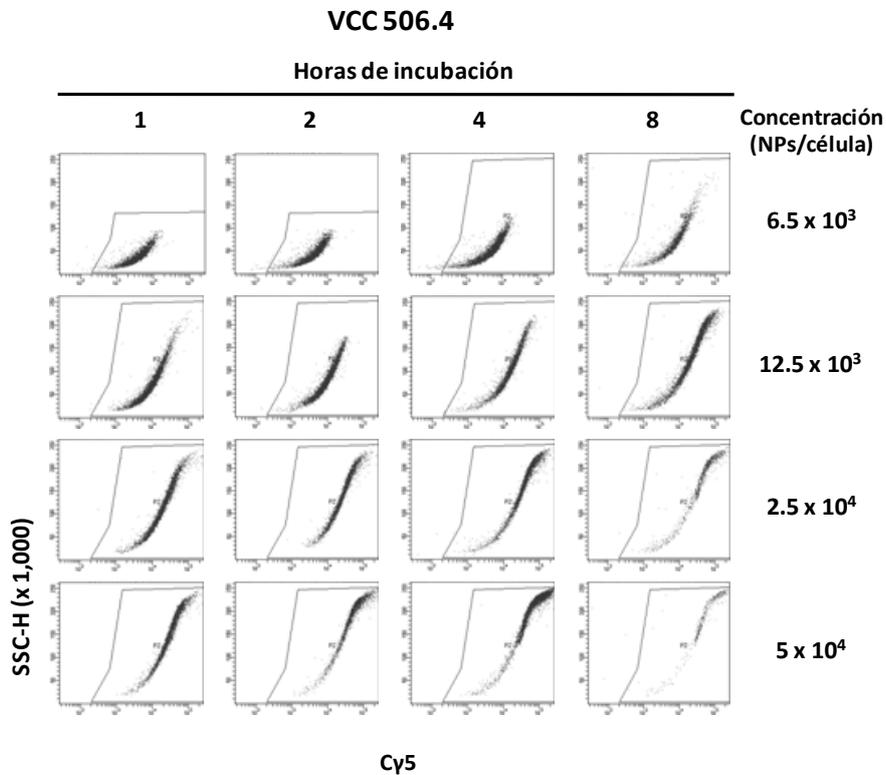


Figura 62. Dot-plot representativo de las células fluorescentes para Cy5 incubadas con VCC 506.4 a diferentes concentraciones y diferentes tiempos.

3.3. EFECTOS DE ANTI-MIR-21-5P VEHICULIZADO POR NANOPARTÍCULAS

Con el fin de evaluar el efecto de estas NPs como vehículos de anti-miRs terapéuticos, se les unió a las NPs-COOH, VCC 506.3, el anti-miR-21-5p, siguiendo el protocolo previamente establecido por el grupo de la Dra. Sánchez. Se ha empleado el miR-21-5p ya que ha sido descrito como un miR ligado a características de CSCs, con una notable función antiapoptótica (Devulapally, Sekar et al. 2015). Para evaluar el efecto de su inhibición, incubamos células ALDH⁺ de la línea G-361 aisladas por FACS con 12.5×10^3 NPs marcadas con Cy5 y unidas al anti-miR-21-5p durante 4 horas utilizando como control estas células incubadas con la NP-NH₂, VCC 506.4, en ausencia del anti-miR. Como pudimos comprobar, la entrada en las células de las NPs unidas al anti-miR era elevada, pese que fue ligeramente menor que en el caso de las NPs amino funcionalizadas (VCC 506.4) (Figura 63).

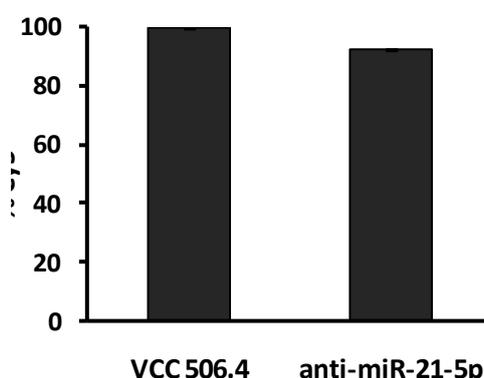


Figura 63. Porcentaje de células positivas para Cy5 tratadas con NPs VCC 506.4 y unidas al anti-miR-21-5p.

Finalmente llevamos a cabo el estudio del efecto de las NPs unidas al anti-miR-21-5p sobre la subpoblación ALDH⁺. Nuestros resultados preliminares señalan que la inhibición de este miR podría tener un efecto negativo sobre la formación de esferas, como indican las imágenes obtenidas 24 horas tras la incubación (Figura 64). No obstante, son necesarios más estudios para clarificar el efecto del anti-miR en CSCs.

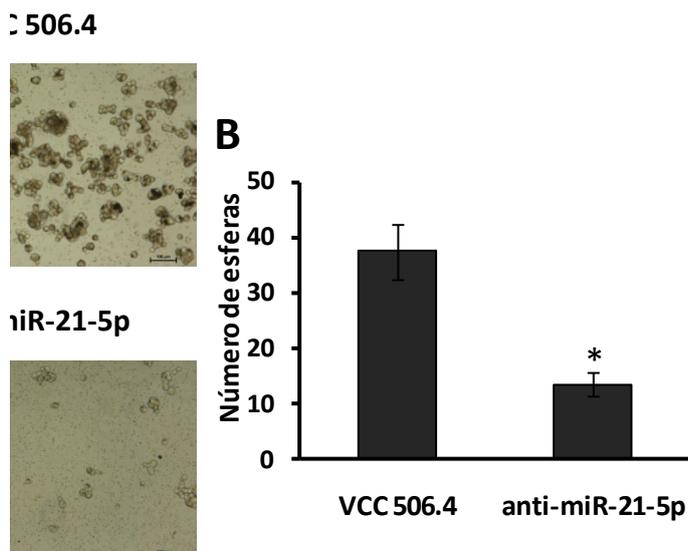


Figura 64. (A) Imagen representativa y (B) número de esferas formadas de células ALDH⁺ de la línea G-361 en medio de esferas incubadas con VCC 506.4 y con NPs unidas a anti-miR-21.

4. EFECTO DE NUEVOS FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

4.1. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE COMPUESTOS DE PURINA, DERIVADOS DE 5-FU Y *P*-NITROBENZENOSULFONAMIDAS SOBRE LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS PROCEDENTES DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y MELANOMA

Para evaluar la eficacia de nuevos compuestos antitumorales, ensayamos el efecto antiproliferativo de una serie de compuestos de purina y derivados de 5-FU frente a las líneas cancerígenas MCF7, HCT 116, A-375 y G-361.

Como se muestra en la Tabla 7, los derivados 2,6-dicloropurina (FMM238bF2, FMM238bF3) mostraron un mayor efecto antiproliferativo frente a las líneas cancerígenas MCF7, HCT 116, A-375 y G-361. El derivado *N*-9 (FMM238bF2) mostró una mayor actividad en todas las líneas celulares que los regioisómeros *N*-7 (FMM238bF3). En general, los derivados purina *N*-9 presentaron un aumento de la actividad respecto a sus regioisómeros *N*-7,

excepto en el caso de las 6-cloropurinas (FMM262bF2, FMM264bF1) en las líneas celulares de melanoma A-375 y G-361, en las que ambos regioisómeros tienen el mismo potencial inhibitorio. Por otra parte, los derivados de 5-FU presentaron un potencial intermedio ($CI_{50} \approx 22$ y $50 \mu M$), siendo el isómero *N*-1 (FMM298cF1) más activo que el isómero *N*-3 (FMM298dF1) frente a las líneas MCF7 y A-375, aunque no en el caso de las líneas celulares HCT 116 y G-361 (Tabla 7).

Tabla 7. Actividades antiproliferativas de los compuestos de purina y derivados de 5-FU frente a las líneas celulares cancerígenas MCF-7, HCT 116, A-375 y G-361. Los datos se muestran como media \pm SD.

Compuesto	$CI_{50}(\mu M)$ MCF7	$CI_{50}(\mu M)$ HCT 116	$CI_{50}(\mu M)$ A-375	$CI_{50}(\mu M)$ G-361
FMM298cF1	25.2 \pm 0.03	24.6 \pm 0.01	38.4 \pm 0.06	29 \pm 0.01
FMM298dF1	30.5 \pm 0.03	22.6 \pm 0.01	50.9 \pm 0.13	25.4 \pm 0.01
FMM262bF2	35.1 \pm 0.03	5.27 \pm 0.04	18.9 \pm 0.09	21.4 \pm 0.01
FMM262bF3	49.8 \pm 0.03	68 \pm 0.04	14.5 \pm 0.12	21.4 \pm 0.01
FMM264bF1	14.1 \pm 0.06	23.5 \pm 0.04	13.4 \pm 0.03	15.8 \pm 0.01
FMM264c	20.2 \pm 0.06	55.7 \pm 0.04	26.7 \pm 0.01	18.3 \pm 0.01
FMM238bF2	3.93 \pm 0.04	6.20 \pm 0.05	1.18 \pm 0.03	3.06 \pm 0.01
FMM238bF3	5.63 \pm 0.03	6.36 \pm 0.06	4.98 \pm 0.07	5.67 \pm 0.01

En una segunda fase de evaluación, se han estudiado los efectos en la proliferación celular de una serie de compuestos, en este caso derivados de *p*-Nitrobenzeno y dansyl sulfonamidas, en las líneas celulares MCF7, HCT 116 y A-375. Como se muestra en la Tabla 8 la mayor parte de estos compuestos fueron muy activos frente a las líneas de cáncer de mama, colon y melanoma, mostrando actividades antiproliferativas muy elevadas, especialmente frente a la línea de melanoma A-375, siendo FMM212eF3 el compuesto más activo ($0.13\pm 0.03 \mu M$) (Tabla 8).

Tabla 8. Actividades antiproliferativas frente a las líneas celulares MCF-7, HCT 116 y A-375. Los datos se muestran como media \pm SD.

Compuesto	CI ₅₀ (μ M) MCF-7	CI ₅₀ (μ M) HCT 116	CI ₅₀ (μ M) A-375
F4	12.20 \pm 0.08	3.10 \pm 0.03	0.66 \pm 0.02
F2	12.10 \pm 0.03	3.06 \pm 0.02	1.38 \pm 0.04
F2	1.17 \pm 0.03	15.87 \pm 0.03	1.33 \pm 0.02
F2	15.15 \pm 0.04	13.68 \pm 0.04	6.55 \pm 0.06
F1	2.20 \pm 0.05	2.62 \pm 0.05	0.34 \pm 0.01

4.2. EFECTO DE LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS, DERIVADOS DE PURINA Y *P*-NITROBENZENOSULFONAMIDAS, SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y MELANOMA

Para estudiar el mecanismo de la actividad antitumoral de los compuestos más activos derivados de purinas (FMM238bF2 y FMM238bF3), se analizaron por citometría de flujo los efectos en el ciclo celular y apoptosis de estos compuestos sobre las líneas MCF7, HCT 116 y A-375, como representación de líneas cancerígenas de mama, colon y melanoma. En las células de la línea MCF7 tratadas durante 24 horas con los compuestos FMM238bF2 y FMM238bF3 no se encontraron diferencias significativas en la progresión del ciclo celular en comparación con las células control tratadas con DMSO. Encontramos un ligero arresto en las fases G₂/M y S inducido por FMM238bF2 (54.63 \pm 1.18) y FMM238bF3 (18.27 \pm 0.79), respectivamente (Figura 63).

En las células tratadas de las líneas HCT 116 y A-375, el compuesto FMM238bF2 no modificó el perfil del ciclo celular. Por su parte, el compuesto FMM238bF3 provocó un arresto en la fase G₂/M (28.47 \pm 0.07) a expensas de

la fase G₀/G₁ (33.58 ± 1.90) en las células de la línea HCT 116. Sin embargo, en las células de la línea A-375 tratadas con este compuesto, provocó un arresto de estas células en la fase G₀/G₁ (70.55 ± 1.47) a expensas de las fases G₂/M y S (20.10 ± 0.75 y 9.34 ± 0.62, respectivamente) (Figura 63).

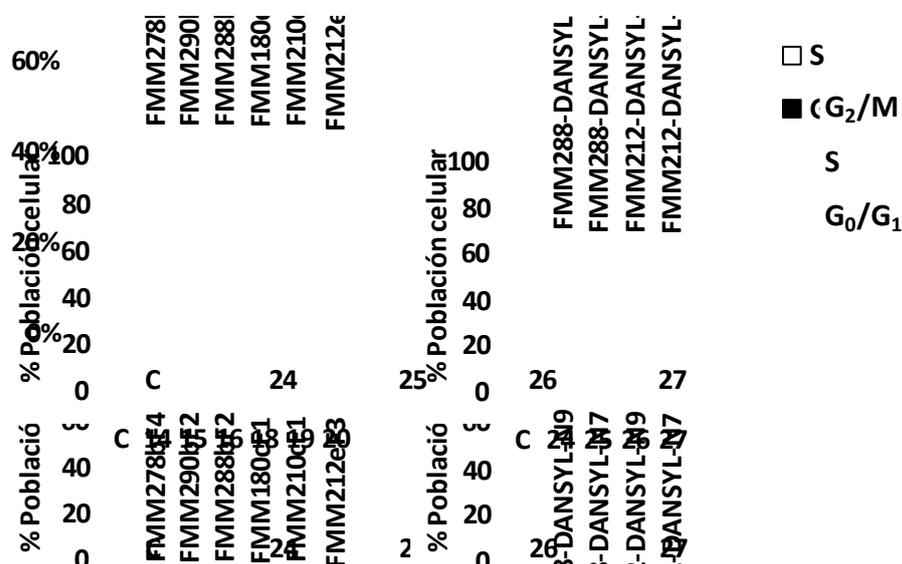


Figura 63. Distribución del ciclo celular en las líneas MCF7, HCT 116 y A-375 tratadas con los compuestos FMM238bF2 y FMM238bF3. Datos mostrados como media ± SD.

Aunque las líneas celulares tratadas con los compuestos FMM238bF2 y FMM238bF3 mostraron diferentes patrones de ciclo celular, ambos compuestos indujeron altos niveles de apoptosis en todas las líneas celulares en comparación con los cultivos celulares tratados con DMSO (Figura 64).

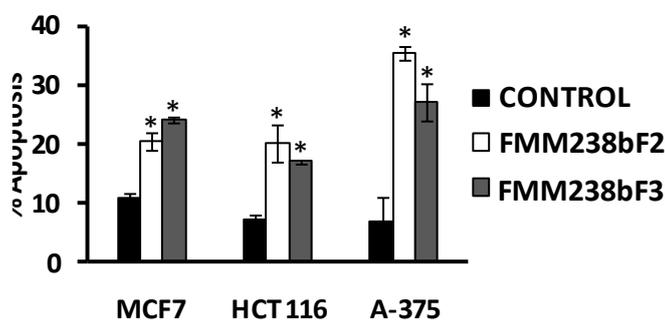


Figura 64. Porcentaje de apoptosis total de las células de las líneas MCF7, HCT 116 y A-375 tratadas con los compuestos FMM238bF2 y FMM238bF3. Datos mostrados como media ± SD (* p < 0.05).

Del mismo modo, se estudio el efecto de los compuestos derivados de *p*-Nitrobenzenosulfonamidas más activos en la distribución del ciclo celular a las 24 y 48 horas en la línea A-375. Como se muestra en la Figura 65 los compuestos FMM290bF2, FMM180cF1, FMM210cF1 y FMM212eF3 provocaron un arresto del ciclo celular en la fase G₂/M a expensas de las otras dos fases (26.60%, 34.40%, 32.27% y 21.36% respectivamente, en contraste al 8.71% del control) (Figura 65).

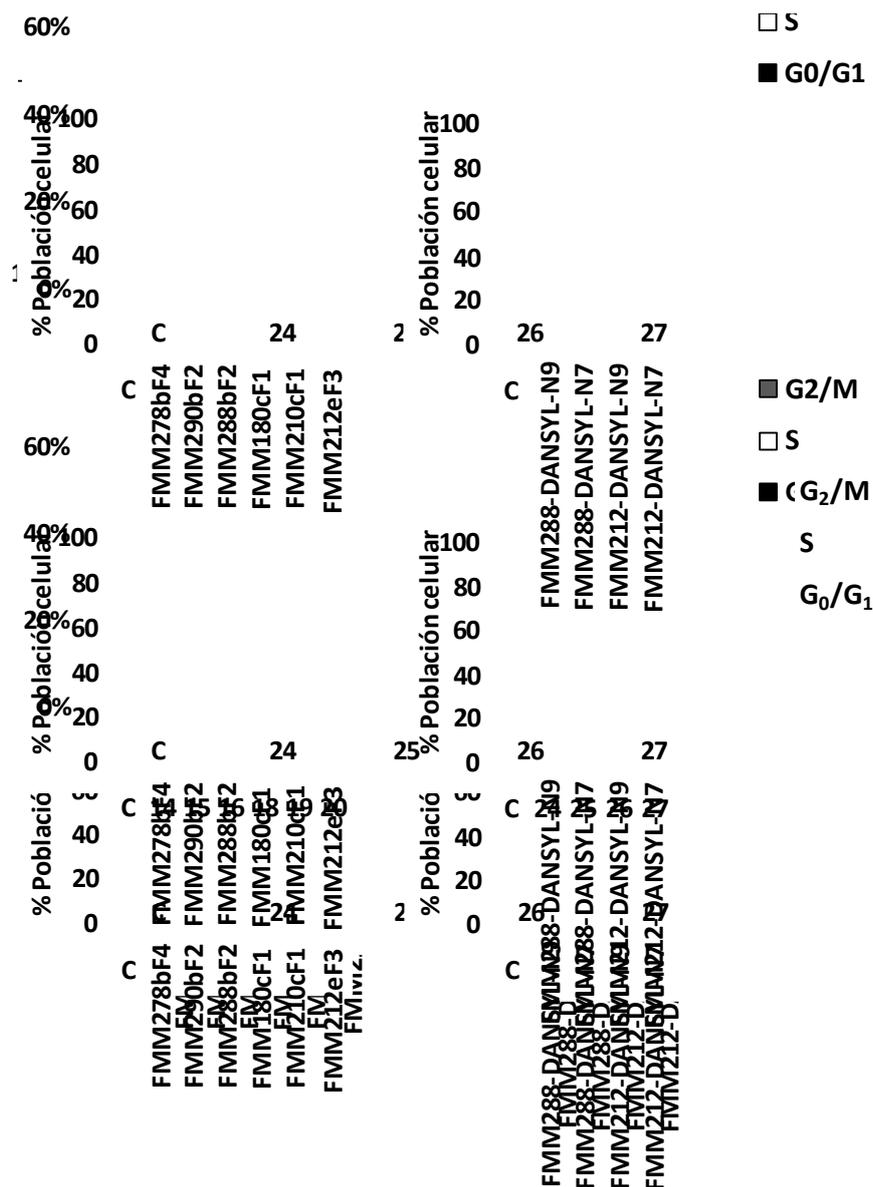


Figura 65. Distribución del ciclo celular en la línea A-375 tratada con los compuestos mostrados durante 24 y 48 horas respecto a las células control tratadas con DMSO (C = control). Datos mostrados como media ± SD.

Además, fue estudiado el efecto de estos compuestos más activos sobre la apoptosis después de 24 y 48 horas de tratamiento de la línea A-375, siendo más apoptóticos los compuestos FMM180cF1, FMM210cF1 y FMM212eF3 (Figura 66).

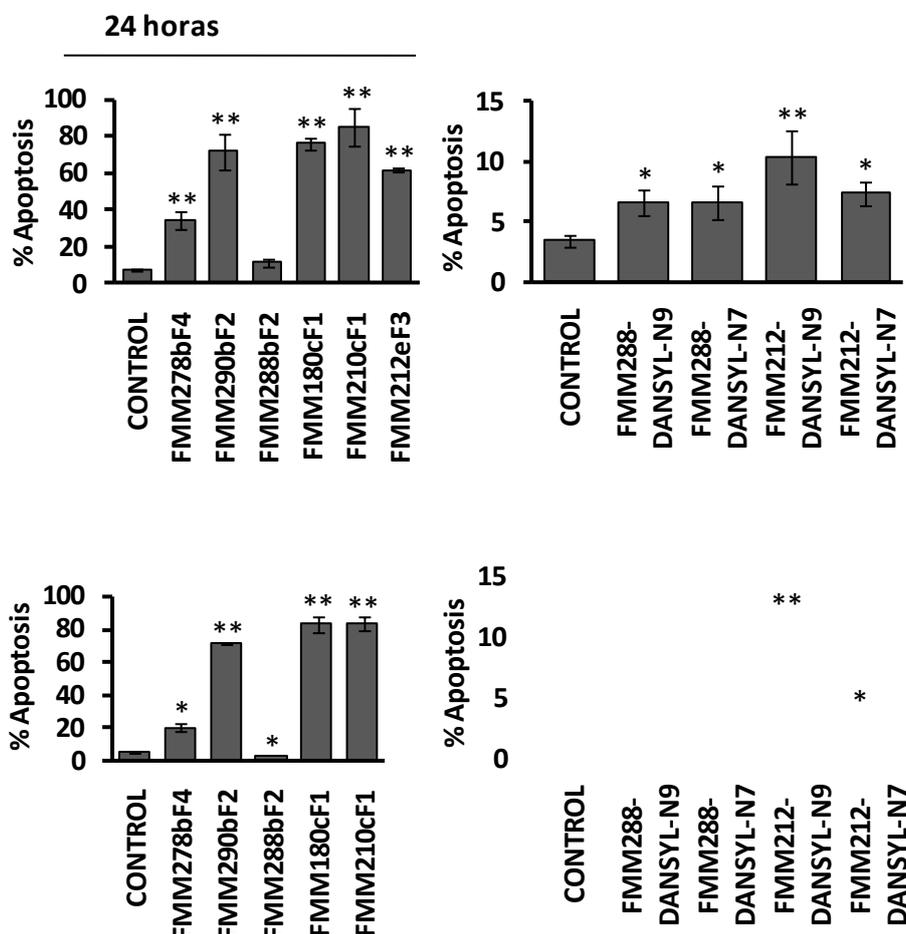


Figura 66. Porcentaje de apoptosis de la línea A-375 tratada con los compuestos más activos respecto a las células control tratadas con DMSO. Datos mostrados como media \pm SD (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

4.3 ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE COMPUESTOS SELECCIONADOS SOBRE SUBPOBLACIONES ALDH⁺ DE MELANOMA

En función de los resultados obtenidos en los análisis anteriores, seleccionamos dos de los compuestos más activos (FMM180cF1 y FMM212eF3) para evaluar su capacidad antiproliferativa sobre la subpoblación

ALDH⁺ de la línea A-375 aislada por FACS. Como se muestra en la Tabla 9 el compuesto FMM212eF3 mostró una alta actividad antiproliferativa frente a la subpoblación ALDH⁺ (Tabla 9), por lo que fue seleccionado para estudios posteriores junto con su análogo fluorescente, FMM212-DANSYL-N9.

Tabla 9. Actividades antiproliferativas de los compuestos FMM180cF1 y FMM212eF3 frente a la línea A-375 y su subpoblación ALDH⁺ aislada por FACS. Los datos se muestran como media \pm SD.

Compuesto	IC50 (μ M)	IC50 (μ M)
	ALDH ⁺	TP
FMM180cF1	23.41 \pm 0.05	8.17 \pm 0.02
FMM212eF3	6.97 \pm 0.03	2.43 \pm 0.03

4.4. DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO DERIVADO DE *P*-NITROBENZENOSULFONAMIDAS

En estudios previos el compuesto más activo (FMM212eF3) junto con su análogo fluorescente (FMM212-DANSYL-N9) no mostraron toxicidad *in vivo*. FMM212-DANSYL-N9 fue utilizado para estudiar la distribución en el organismo, mostrando todos los órganos y tejidos *ex vivo* de los ratones tratados con este compuesto una alta intensidad de fluorescencia, excepto el páncreas y los pulmones (Morales, Ramírez et al. 2015, en revisión).

Para estudiar la distribución celular de este compuesto, las líneas celulares MCF7, HCT 116 y A-375 fueron tratadas y, posteriormente, se midió la fluorescencia de estas células desde 30 minutos a 2 horas después del tratamiento. Como se observa en la Figura 67 la cantidad de compuesto en el interior celular aumentó de forma dependiente del tiempo, siendo mayor el incremento de las cantidades del compuesto en el interior celular para la línea MCF7 de los 30 minutos a 1 hora. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas después de dos horas de tratamiento (Figura 67).

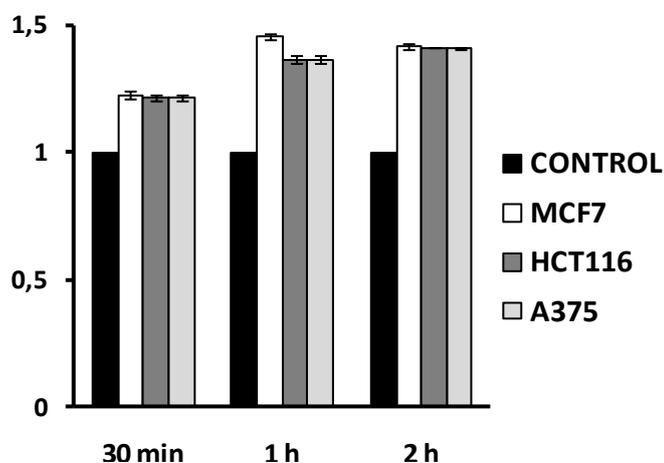


Figura 67. Cambios en el incremento de las cantidades de FMM212-DANSYL-N9 en las células tratadas a diferentes tiempos.

Para estudiar la entrada y distribución de este compuesto fluorescente, fueron tomadas imágenes de microscopia confocal de células A-375 tratadas con FMM212-DANSYL-N9. Como muestran las imágenes de la Figura 68, tras 1 hora de tratamiento, el compuesto fue internalizado por un alto porcentaje celular y este se distribuía por la zona perinuclear. Después de 2 horas, la mayoría de las células mostraron un aumento de la intensidad de la fluorescencia y en algunas de ellas se localizó en el interior del núcleo (Figura 68). Después de 4 horas una significativa fracción del compuesto estaba en el interior de los núcleos (Figura 69).

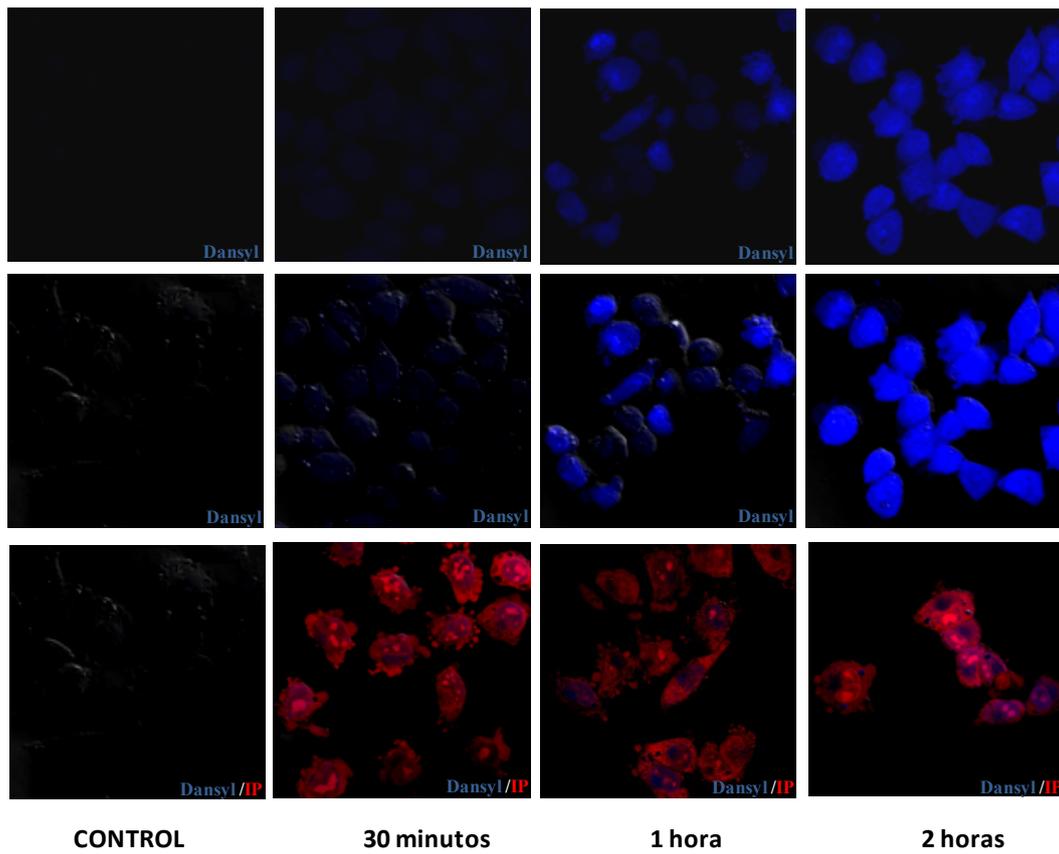


Figura 68. Imágenes de microscopia confocal representativas de células de la línea A-375 control (no tratadas) y tratadas con FMM212-DANSYL-N9 a diferentes tiempos.

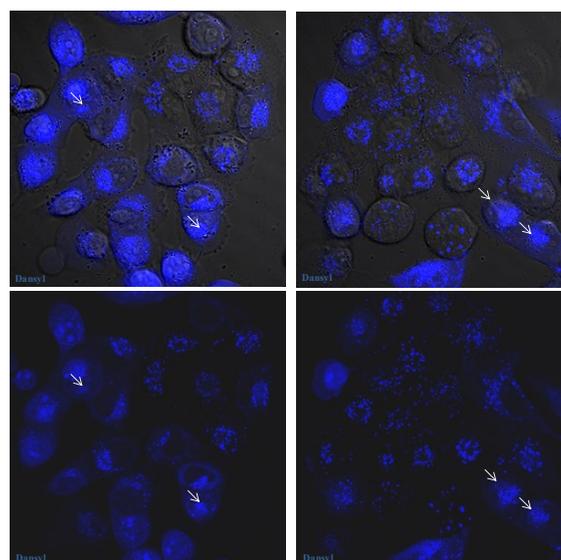


Figura 69. Imágenes de microscopia confocal representativas de células de la línea A-375 tratadas con FMM212-DANSYL-N9 durante 4 horas.

DISCUSIÓN

La definición y el concepto del cáncer han ido evolucionando a lo largo del tiempo de forma considerable. Tradicionalmente, se consideraba que un tumor procedía de células adultas anormales que se dividían sin control. Actualmente, el cáncer se va entendiendo como un órgano tumoral heterogéneo donde las relaciones de las células tumorales con las células de su entorno dan lugar a un ambiente complejo. Por tanto, el cáncer se considera una enfermedad compleja, en la cual aparece una heterogeneidad entre tumores del mismo órgano (heterogeneidad intertumoral) (Visvader 2011), así como dentro del tumor (heterogeneidad intratumoral). Dentro del tumor existe una jerarquía en la que las células tumorales son mantenidas por una subpoblación pequeña de CSCs (Reya, Morrison et al. 2001). Las CSCs son consideradas como la raíz del cáncer, por lo que la identificación y eliminación de estas células es crítica para que la terapia sea efectiva de forma definitiva. La mayoría de las terapias utilizadas actualmente se dirigen a células de rápido crecimiento, por lo que el lento crecimiento o estado quiescente de estas células las protege de ser eliminadas por los fármacos actuales (Tirino, Desiderio et al. 2013). Además, las CSCs poseen otras características que las protegen tanto de la quimioterapia como de la radioterapia, como son la posesión de un mecanismo protector de reparación del ADN, la sobreexpresión de genes antiapoptóticos, la expresión de una gran cantidad de transportadores ABC, que les permite expulsar los fármacos (Shigdar, Li et al. 2014) y mayores niveles de sistemas de defensa antioxidantes (Liu, Chen et al. 2011). Además, a esta subpoblación celular se la considera la responsable de las recidivas y la metástasis (Ajani, Song et al. 2015). Por ello, el aislamiento de estas CSCs es fundamental para poder entender los procesos biológicos que dan lugar a sus características de resistencia e iniciación de nuevos tumores, con el objetivo de desarrollar terapias dirigidas específicas frente a estas células. Su aislamiento es complejo debido a su bajo número dentro de la masa tumoral y a la baja especificidad de los biomarcadores que las definen, necesitándose usar diferentes metodologías para su correcta caracterización. Comúnmente son aisladas por FACS, un método costoso y que afecta considerablemente a la viabilidad celular. Por ello, es importante el desarrollo de nuevas metodologías que permitan un correcto aislamiento de estas subpoblaciones de CSCs, para la búsqueda de posibles dianas terapéuticas específicas. Una posible diana

terapéutica es la inhibición de miRs sobreexpresados en CSCs mediante anti-miRs, siendo estos fácilmente transportables debido a su pequeño tamaño (Leal and Leonart 2013). Además de este posible frente de acción, otra posible línea de investigación es el desarrollo de nuevos fármacos con actividad frente a CSCs, como el compuesto Bozepinib, cuya eficacia frente a CSCs hemos demostrado recientemente tanto *in vitro* como *in vivo* (Ramirez, Boulaiz et al. 2014).

Las subpoblaciones con baja capacidad de adherencia están enriquecidas en células con características de CSCs

En los experimentos realizados a partir de la obtención de diferentes subpoblaciones en base a su capacidad de adhesión, hemos demostrado que la subpoblación celular con menos capacidad de adherencia tiene propiedades características de células madre. Por ello, la tripsinización diferencial, una metodología extendida para el establecimiento de cultivos de células epiteliales primarias (Owens, Smith et al. 1974; Garcia-Posadas, Arranz-Valsero et al. 2013), puede ser aplicada para el aislamiento de células con propiedades de CSCs a partir de líneas establecidas o de cultivos primarios de cáncer de mama y colon, así como para otros tipos de cánceres con origen epitelial. Mediante el protocolo desarrollado hemos demostrado que pueden ser aisladas dos subpoblaciones diferentes; una subpoblación con propiedades de CSCs y baja capacidad de adherencia (TS), y una subpoblación con una alta capacidad de adherencia y enriquecida en células cancerígenas más diferenciadas (TR).

Las subpoblaciones TS de cáncer de mama y colon están enriquecidas en células con una alta actividad ALDH y una gran proporción de SP, siendo estas características asociadas con propiedades de CSCs. Se ha demostrado que el aislamiento de una subpoblación con una alta actividad ALDH muestra un mayor potencial tumorigénico en cáncer de mama y colon (Ginestier, Hur et al. 2007; Huang, Hynes et al. 2009). En cuanto a la capacidad de expulsar Hoechst 33342, diferentes estudios muestran que el fenotipo SP está enriquecido en células con características de CSCs en diferentes tumores, incluyendo cánceres de mama y colon (Haraguchi, Inoue et al. 2006; Britton,

Kirby et al. 2011). Además, la habilidad para expulsar Hoechst 33342 es asociada con una sobreexpresión de transportadores ABC que confieren resistencia a multidroga, una característica específica de CSCs (Natarajan, Xie et al. 2012).

La determinación de la expresión de marcadores de superficie específicos es el método de identificación y aislamiento de CSCs más extendido. Por ello, hemos demostrado que las subpoblaciones TS de la línea de cáncer de mama MCF7 está enriquecida en células con fenotipo $CD44^+/CD24^-$, el cual es característico de CSCs de mama (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Por otro lado, las subpoblaciones TS de las líneas de cáncer de colon HT-29 y T84 están enriquecidas en células con fenotipo $CD44^+$, $CD133^+$ y/o $CD326^+$. Las CSCs de colon fueron por primera vez identificadas en base a su expresión de CD133, siendo determinada que la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes NOD/SCID estaba restringida a células $CD133^+$ (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). En un estudio posterior, Dalerba *et al.* demostraron que la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes fue restringida a una subpoblación minoritaria con fenotipo $CD326^{high}/CD44^+$. Además, los tumores originados a partir de células $CD326^{high}/CD44^+$ reproducen la heterogeneidad morfológica y fenotípica completa de sus tumores parentales (Dalerba, Dylla et al. 2007). En cuanto a las subpoblaciones TS de la línea MDA-MB-231, no hubo cambios significativos en el porcentaje de células $CD44^+/CD24^-$, sin embargo, el porcentaje de células con este fenotipo en todas las subpoblaciones obtenidas en base a su capacidad de adhesión, así como de TP fue muy alto, alrededor del 80%, lo cual está en concordancia con la gran capacidad invasiva/metastásica de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas (Xu, Prospero et al. 2015).

Las células de cáncer de mama y colon aisladas por tripsinización diferencial también difieren en su capacidad de autorrenovación. La autorrenovación de las CSCs puede ser ensayada *in vitro* por la formación de tumorosferas y mediante el ensayo de formación de colonias holoclónicas (Shigeishi, Biddle et al. 2013). Las subpoblaciones TS obtenidas de las líneas celulares de cáncer de mama y colon generaron más esferas y más colonias en agar blando. Se ha demostrado que las CSCs de colon enriquecidas en células

CD133⁺ forman más colonias en agar blando y esto es usado como un indicador de su mayor capacidad de iniciar tumores (Puglisi, Sgambato et al. 2009). Además, se ha demostrado que las células de cáncer de mama de la línea MDA-MB-231 enriquecidas en células madre iniciadoras de tumores tienen una mayor capacidad para formar colonias (Zhao, Pan et al. 2014). Por otro lado, las CSCs tienen la habilidad de formar esferas en superficies de cultivo de baja adherencia y medio de cultivo libre de suero (Rappa, Mercapide et al. 2008; Kanwar, Yu et al. 2010). En contraste, el número de colonias y esferas formadas por las células de la subpoblación TR fue significativamente menor que las formadas por TP, indicando una menor capacidad de autorrenovación y por ello, un estado más diferenciado de la subpoblación de células cancerígenas seleccionadas por una mayor capacidad de adhesión a la superficie de cultivo celular.

En todos estos estudios *in vitro*, las propiedades fenotípicas y funcionales de las CSCs estaban notablemente aumentadas en las subpoblaciones TS para todas las líneas celulares, excepto para la expresión de CD44⁺/CD24⁻ en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 que es basalmente muy alta en TP. Por esta razón, seleccionamos esta línea celular para desarrollar los estudios posteriores. El análisis de diferentes mRNAs y miRs relacionados con EMT, autorrenovación y/o agresividad demostraron diferencias en su expresión entre las subpoblaciones TR y TS. El perfil genético de las células TS de la línea MDA-MB-231 se asoció más a un fenotipo mesenquimal mientras que la subpoblación TR estuvo más relacionada con un fenotipo epitelial. Durante el proceso de EMT, las células cancerígenas pierden su capacidad de adhesión al nicho epitelial y adquieren un fenotipo mesenquimal característico de las células metastásicas (Cervantes-Arias, Pang et al. 2013). Las células TS de la línea MDA-MB-231 mostraron una pérdida de expresión de e-cadherina y claudina. La pérdida en las células de carcinoma de e-cadherina, una molécula clave en la adhesión intercelular, la cual establece uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, es la alteración mejor caracterizada durante el proceso de EMT (Hanahan and Weinberg 2011; Cervantes-Arias, Pang et al. 2013). Respecto a la expresión de claudina, un fenotipo bajo en su expresión, es asociado con un enriquecimiento en

marcadores de EMT, genes de respuesta inmune, características relativas a CSCs y mal pronóstico en cáncer de mama (Sabatier, Finetti et al. 2014). Además, la subpoblación TS también mostró una mayor expresión de varios factores de transcripción que modulan EMT, como *SNAIL* o *SLUG*, y otros marcadores mesenquimales incluyendo n-cadherina y vimentina (Wang, Lu et al. 2014). En contraste, la expresión de esos genes fue contrariamente regulada en la subpoblación TR de MDA-MB-231, mostrando sus características más epiteliales.

Ciertos factores de transcripción de células madre embrionarias (ES-TFs, del inglés *embryonic stem cell transcription factors*) como OCT4, SOX2 y NANOG, reguladores principales de la autorrenovación y pluripotencia de las células embrionarias, están también sobreexpresados en CSCs (Liu, Yu et al. 2013). La expresión de *OCT4* fue medida en las subpoblaciones de la línea MDA-MB-231, demostrando que se sobreexpresa en la subpoblación TS. Interesantemente, un estudio reciente muestra que OCT4 es asociado con un mal pronóstico y regula positivamente el proceso de EMT, contribuyendo a la metástasis de cáncer de mama (Wang, Lu et al. 2014). Además, las CSCs muestran similitudes con las células madre normales en la regulación de las rutas de señalización, y en la expresión de varios genes, incluyendo *BMI1*, o la familia *HOX* entre otros, los cuales están involucrados en la autorrenovación de células madre (Liu, Dontu et al. 2006). *BMI1*, el cual se sobreexpresa en las células TS, ha sido relacionado con el proceso de EMT y resistencia a drogas (Paranjape, Balaji et al. 2014). Además, *CXCL10* es sobreexpresado en los tumores basales cuando se comparan con los tumores ER⁺, siendo asociado con un mayor grado tumoral y peor pronóstico en cáncer de mama (Mulligan, Raitman et al. 2013).

Todos juntos, estos datos demuestran que la tripsinización diferencial en los cultivos celulares de cáncer de mama y colon permiten el aislamiento de dos subpoblaciones (TR y TS) que difieren en sus propiedades celulares relacionadas con CSCs. Las células de la subpoblación TS muestran un incremento en la actividad ALDH, proporción de SP y fenotipo CSCs. Esta subpoblación está enriquecida en células que han seguido un proceso de EMT y poseen una alta habilidad de autorrenovación. Además, las células TS

muestran una mayor habilidad para formar tumorosferas y colonias *in vitro*; y mayor potencial tumorigénico y metastásico *in vivo*. En contraste, la subpoblación TR está principalmente compuesta por células cancerígenas más diferenciadas, con menor capacidad tumorigénica *in vitro* e *in vivo*. En un estudio previo, llevado a cabo por Walia y Elbe, mostraron que la subpoblación TS, obtenida por tripsinización diferencial a partir de células epiteliales de mama transformadas, estaba enriquecida en células con propiedades de células madre (Walia and Elble 2010). En un estudio más reciente, esta metodología fue usada para aislar una subpoblación de células con un fenotipo mesenquimal a partir de una línea de células epiteliales de mama humanas oncogénicas transformadas (Tam, Lu et al. 2013). Sin embargo, esos estudios estuvieron limitados a determinar la expresión de marcadores EMT, capacidad en la formación de mamosferas, resistencia a fármacos y expresión de CD44/CD24, y fueron llevados a cabo con líneas de epitelio mamario humano oncogénicas transformadas bien diferenciadas.

Expresión diferencial de miRs en CSCs, células tumorales no stem y células no tumorales

Los miRs desarrollan papeles claves en la regulación de una amplia gama de procesos biológicos y patológicos, por lo que el patrón de expresión de miRs revela diferencias entre tejidos normales y cancerígenos, y entre diferentes tipos cancerígenos (Lu, Getz et al. 2005). El uso de predicciones bioinformáticas mediante programas como TargetScan, PicTar o miRanda-mirSVR han sido de gran utilidad como paso inicial en la búsqueda, tanto de dianas de miRs como de miRs que interfieren con diferentes mRNAs (He, Zeng et al. 2015; Rasheed, Teo et al. 2015; Wang, Zhao et al. 2015; Yang, Sun et al. 2015). En el análisis de los perfiles de expresión de miRs realizado en las subpoblaciones aisladas en base a su capacidad de adhesión de la línea MDA-MB-231 hemos utilizado como normalizador el miR-24c-3p, ya que este miR mostró una expresión más estable entre TR₂, TP y TS₁. Este miR ha sido utilizado como normalizador en células de cáncer de próstata CD44⁺ y CD44⁻ (Liu, Kelnar et al. 2011) y ha sido validado su uso entre muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes de neuroblastoma, así como entre

muestras de médula ósea y sangre periférica de estos pacientes e individuos sanos (Viprey, Corrias et al. 2012). En nuestro trabajo ha sido demostrada la importancia de la validación de genes de referencia en células y/o tejidos específicos, no existiendo un normalizador general para cualquier tipo de muestra. Aunque U6 es comúnmente utilizado para la normalización de miRs (Sun, Yang et al. 2015; Zhang, Gu et al. 2015; Zheng, Jiang et al. 2015) en nuestros estudios se sobreexpresó en las subpoblaciones con características de CSCs, así como en líneas tumorales de cáncer de colon (HT-29 y HCT 116) en comparación con la línea de colon no tumoral (CCD-18Co), al igual que rRNA 5S. En cambio, SNORD44 no tiene una expresión estable en CSCs y células cancerígenas diferenciadas, pero es apto para su utilización como normalizador en el estudio de la expresión diferencial de miRs en las líneas HT-29, HCT 116 y CCD-18Co. El RNA pequeño U6, el cual forma parte del espliceosoma (Bessonov, Anokhina et al. 2008), se presenta en mayores niveles en suero de pacientes de cáncer de mama frente a individuos sanos, al igual que rRNA5S. Sin embargo, los niveles de SNORD44 en este estudio fueron muy similares entre los dos grupos (Appaiah, Goswami et al. 2011). Interesantemente, se ha demostrado que proteínas de la ruta del espliceosoma están sobreexpresadas en carcinoma hepatocelular (Xu, Huang et al. 2015). En un estudio reciente, se ha demostrado que U6 también fue el menos estable de todos los posibles normalizadores estudiados en plasma de carcinoma hepatocelular (Tang, Shen et al. 2015). Entre muestras de pacientes con cáncer endometrial y muestras de tejido sano, tanto los niveles de U6 como de RNU6B fueron muy inestables, sin embargo si fueron estables los niveles de SNORD44 (Torres, Torres et al. 2013). RNU6B es un pseudogén frecuentemente utilizado como normalizador; sin embargo, no se mantuvo estable en un estudio realizado con muestras de meduloblastoma, dos poblaciones de células madre neuronales CD133⁺ y dos poblaciones de células de progenitores neuronales CD133⁻ (Genovesi, Anderson et al. 2012), al igual que en muestras de tejidos de cáncer de próstata. No obstante, SNORD44 si fue apto como normalizador (Carlsson, Helenius et al. 2010). Aunque SNORD44 se mostró estable en los estudios anteriormente nombrados, no mostró estabilidad óptima para su uso como normalizador, al igual que RNU6B, entre pacientes con carcinoma renal (metastásico y no metastásico) y en

tejidos de individuos sanos. Además, se observó un aparente aumento de RNU6B en muestras con una alta degradación del RNA (Wotschofsky, Meyer et al. 2011). En base a los resultados obtenidos, es importante aclarar que cada tipo de estudio requiere la búsqueda de un normalizador adecuado, ya que la aptitud o no de un normalizador, como ocurre con SNORD44, puede diferir entre experimentos. Por su parte, la utilización de SNORD24 como normalizador no fue considerada en nuestros estudios, ya que mostró una expresión inestable y muy baja ($Ct > 29$).

Tras la evaluación de los normalizadores hemos estudiado los patrones de expresión de diferentes miRs relacionados con propiedades de CSCs, EMT, metástasis o mal pronóstico. Por ejemplo, la subpoblación TR sobreexpresa miR-93, el cual inhibe la proliferación celular, la capacidad de formar colonias (Leal and Leonart 2013) y promueve el fenómeno MET (Liu, Clouthier et al. 2012). El miR-34a-5p y miR-34c-5p se expresan en menor medida en las células TS y se sobreexpresan en la subpoblación TR. La familia miR-34 fue identificada como supresora de tumores, implicada en la reducción de propiedades de CSCs y en el incremento de la sensibilidad al tratamiento por fármacos por su acción sobre NOTCH1 (Park, Chang et al. 2014), en concordancia con nuestros resultados en las predicciones bioinformáticas. El miR-100 es también sobreexpresado en la subpoblación TR; sus niveles de expresión están relacionados con el estado de diferenciación celular y con una menor expresión en células que expresan marcadores de células madre (Deng, Shang et al. 2014). Se ha demostrado que este miR inhibe el mantenimiento y expansión de CSCs de tumores de mama de tipo basal (Petrelli, Carollo et al. 2015). Además, la expresión de miR-21, un miR bien conocido, el cual está desregulado en varios tipos cancerígenos y está involucrado en carcinogénesis, recurrencia y metástasis (Liu and Fan 2014), estuvo aumentado en la subpoblación TS y disminuido en las células TR.

Debido a que en nuestro estudio, la expresión de SNORD44 sí fue estable en las líneas CCD-18Co, HT-29 y HCT 116, lo utilizamos para realizar el análisis de la expresión de diferentes miRs entre estas líneas. El miR-142-3p estuvo sobreexpresado significativamente en las dos líneas de cáncer de colon

respecto a la línea de colon normal. Esto ocurrió de igual forma para miR-590-5p y miR-15b-5p, aunque en este caso solo se sobreexpresaron en la línea HT-29, no habiendo diferencias significativas entre HCT 116 y CCD-18Co. Se ha demostrado que miR-142 se encuentra sobreexpresado en leucemia linfoblástica de células T aguda (Lv, Zhang et al. 2012) y favorece la activación de la ruta de señalización Wnt en cáncer de mama, mediante la inhibición de la traducción de la proteína APC (Isobe, Hisamori et al. 2014), una proteína relacionada también con adhesión intercelular y apoptosis que se encuentra mutada en el 70-80% de los adenomas esporádicos y cánceres colorrectales (Herzig and Tsikitis 2015). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en las predicciones realizadas, en las que APC aparecía como posible diana de miR-142. Por otra parte, miR-590 se ha encontrado sobreexpresado en líneas celulares de carcinoma renal (Xiao, Tang et al. 2013), hepatocelular (Jiang, Xiang et al. 2012) y en tejidos de cáncer cervical (Chu, Ouyang et al. 2014), estando relacionado con un aumento de la proliferación e invasión. Se ha visto que miR-15b se encuentra sobreexpresado en plasma de pacientes de carcinoma hepatocelular (Liu, Yao et al. 2012) y cáncer de colon (Giraldez, Lozano et al. 2013; Frampton, Krell et al. 2014). Por otra parte, en nuestro análisis tanto miR-199a-5p como miR-370 se expresaron en mayor medida en la línea de colon no tumorigénica CCD-18Co respecto a las líneas tumorales. miR-199 se expresa en menor medida en tejidos cancerígenos hepatocelulares respecto a tejidos adyacentes no tumorales (Murakami, Yasuda et al. 2006). Esto mismo ocurre en cáncer renal (Zhang, Zhang et al. 2014) y cáncer de ovario (Kinose, Sawada et al. 2014). Además, se ha demostrado que los niveles de miR-370 disminuyen en tejidos de cáncer de vejiga (Wang, Chen et al. 2014), gástrico (Li, Xu et al. 2014; Yang, Huang et al. 2014) y tejidos de carcinoma escamoso de laringe (Yungang, Xiaoyu et al. 2014) comparados con controles sanos. En células de cáncer endometriode de ovario, miR-370 suprime la viabilidad celular y la formación de colonias, y aumenta la quimiosensibilidad (Chen, Chen et al. 2014). Además, este miR disminuye su expresión en células de cáncer de mama quimiorresistentes (Lv, Xia et al. 2014). En base a estos resultados, esta expresión diferencial de miRs puede sentar las bases para su estudio en mayor profundidad en tejidos sanos

y cancerígenos de colon para su posterior utilización como marcadores potenciales de diagnóstico y/o pronóstico, así como su uso en terapia.

NPs como herramientas terapéuticas frente a CSCs

Existe la necesidad de buscar otro tipo de terapias, como el uso de anti-miRs específicos frente a CSCs, que provoquen una inducción de la apoptosis o una diferenciación que las sensibilice frente a los fármacos actuales que actúan sobre células con un rápido crecimiento. Por ello, hemos querido validar el uso de miRs ligados a NPs como agentes antitumorales específicos frente a CSCs, usando como modelo un anti-miR frente a miR-21, un miR ampliamente estudiado. Como se ha demostrado en nuestros resultados, existe una sobreexpresión de miR-21 en subpoblaciones con menor capacidad de adherencia y características fenotípicas y funcionales propias de CSCs. miR-21 ha sido ligado al fenotipo de CSCs en una gran variedad de tumores, por lo que su inhibición podría generar una nueva herramienta terapéutica para modular estas células (Kang 2013; Liu, Zhu et al. 2014). Más concretamente, en melanoma, miR-21 se ha relacionado con una mayor invasividad (Martin del Campo, Latchana et al. 2015), una baja supervivencia y alto grado tumoral (Yang, Pfeffer et al. 2015). Además, se ha observado una mayor expresión de miR-21 en lesiones primarias de pacientes con nódulos linfáticos centinelas positivos respecto a las lesiones primarias de pacientes con nódulos linfáticos centinelas negativos (Grignol, Fairchild et al. 2011).

Los efectos de la inhibición de miR-21 han sido estudiados mediante el uso de NPs, provocando una disminución de la capacidad de migración e invasión en cáncer de colon (Asangani, Rasheed et al. 2008) y mama (Devulapally, Sekar et al. 2015). El uso de anti-miRs o miRs terapéuticos puede ser una importante herramienta como futura terapia dirigida a CSCs, ya que su pequeño tamaño y la capacidad de un miR para regular varias moléculas dianas, los hace idóneos para un posible uso en clínica. Las NPs utilizadas en nuestro estudio mostraron una alta internalización en CSCs sin ninguna modificación en el fenotipo celular. Como se ha demostrado, las NPs de 400-500 nm de diámetro son óptimas en términos de etiquetado celular y

biocompatibilidad (Unciti-Broceta, Johansson et al. 2012). En estudios previos, Sanchez–Martin *et al.* sintetizaron y probaron NPs de polietileno en diferentes líneas celulares, incluyendo cultivos primarios y células madre embrionarias (Tsakiridis, Alexander et al. 2009; Alexander, Pernagallo et al. 2010), demostrando que son un eficiente mecanismo de transporte que no afecta a la viabilidad celular. En nuestro estudio la internalización de estas NPs junto a un inhibidor de miR-21 provocó un descenso en la formación de esferas y en la viabilidad celular como se observa en las imágenes. En estudios previos se ha demostrado el efecto antiapoptótico de miR-21 (Chan, Krichevsky et al. 2005; Meng, Henson et al. 2006; Loffler, Brocke-Heidrich et al. 2007; Devulapally, Sekar et al. 2015), por lo que la inhibición de este miR puede provocar un efecto pro-apoptótico en estas células, sin embargo, es necesario el desarrollo de más experimentos para esclarecer su mecanismo de acción.

Desarrollo de fármacos selectivos frente a CSCs

Otro tipo de terapia se basa en la necesidad de identificar nuevos compuestos anticancerígenos que actúen selectivamente sobre las CSCs, y para ello, en el desarrollo de este trabajo hemos ensayado varios grupos de compuestos sintéticos. Respecto a los compuestos ensayados, observamos que la actividad antiproliferativa de los derivados de purina fue mayor que la de los compuestos derivados de 5-FU, siendo además mayor la actividad de los regioisómeros *N*-9. Interesantemente, del primer grupo, el compuesto FMM238bF2, fue el compuesto más activo (1.18 μ M) y más apoptótico (35.37%) frente la línea celular A-375, pero no modificó el ciclo celular, lo que muestra un mecanismo de acción preferencialmente apoptótico. Además, el hecho de que el compuesto FMM238bF3 reclute a las células en fases G_2/M y G_0/G_1 en las líneas cancerígenas de colon y melanoma, respectivamente, acompañados de altos niveles de apoptosis indican que tienen diferentes efectos citotóxicos en cada tumor.

Respecto al grupo de compuestos de *p*-Nitrobenzenosulfonamidas, los compuestos más activos fueron los derivados de bromo, cloro y dicloropurina (FMM278bF4, FMM290bF2, FMM288bF2, FMM180cF1, FMM210cF1,

FMM212eF3, FMM254bF6, FMM254bF7, FMM288-DANSYL-N9, FMM288-DANSYL-N7, FMM212-DANSYL-N9 y FMM212-DANSYL-N7). Estos compuestos mostraron mejores actividades antiproliferativas frente a todas las líneas ensayadas que los derivados de purina y 5-FU. Los compuestos FMM290BF2, FMM180cF1, FMM210cF1 y FMM212eF3 provocaron un arresto en el ciclo celular en las fases G₂/M. Los compuestos más apoptóticos fueron los compuestos FMM180cF1, FMM210cF1 y FMM212eF3. Los compuestos más activos están basados en una estructura llamada bozepinib, que mostró ser un interesante agente antitumoral frente a CSCs (CI₅₀ = 0.355 μM) (Ramirez, Boulaiz et al. 2014). Además, estos son los compuestos más selectivos frente a la línea celular MCF-7 (Diaz-Gavilan, Gomez-Vidal et al. 2008; Lopez-Cara, Conejo-Garcia et al. 2011). Las dianas potenciales de estos fármacos, basada en la tecnología de microarrays de cDNA, incluyen genes de rutas de señalización que regulan positivamente la apoptosis, así como la represión de genes involucrados en carcinogénesis, proliferación, invasión tumoral y de rutas de señalización relacionadas con CSCs (Caba, Diaz-Gavilan et al. 2011).

La inducción del arresto del ciclo celular en la fase G₂/M por tres compuestos previamente sintetizados en el grupo está asociado con un incremento en la fosforilación de eIF2α en células de cáncer de mama (Conejo-Garcia, Garcia-Rubino et al. 2011), lo cual inhibe la síntesis de proteínas de la célula, con importantes consecuencias citotóxicas.

Una característica de las células tumorales es la resistencia a la apoptosis (Hanahan and Weinberg 2011). La apoptosis es una forma estrictamente regulada de muerte celular que desempeña un papel fundamental en el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos mediante la eliminación de células innecesarias o perjudiciales (Plati, Bucur et al. 2011). Los defectos apoptóticos en las células cancerígenas son el primer obstáculo que limita la eficacia terapéutica de compuestos anticancerígenos, por lo que el desarrollo de fármacos que provoquen este tipo de muerte celular son importantes en la investigación clínica (Cummings, Kinsey et al. 2004; Caba, Rodriguez-Serrano et al. 2012).

Debido a que los compuestos FMM180cF1 y FMM212eF3 fueron los más activos frente a la línea A-375, evaluamos su efecto sobre células ALDH⁺ de esta línea aisladas por FACS. El compuesto FMM212eF3 mostró una alta actividad (CI₅₀=6.97μM) frente a células ALDH⁺ de la línea A-375. El cambio en la CI₅₀ entre la población general crecida en placas adherentes con medio con suero y la población crecida en placas de baja adherencia con medio de esferas libre de suero, puede deberse fundamentalmente a que estas últimas condiciones provocan un aumento en la proporción de células con características de CSCs (Rappa, Mercapide et al. 2008; Kanwar, Yu et al. 2010). El compuesto FMM212eF3 tiene una alta actividad frente a células ALDH⁺, similar a la salinomicina (Ramirez, Boulaiz et al. 2014), la cual se ha descrito como un compuesto con un potente efecto frente a CSCs (Gupta, Onder et al. 2009; Zhi, Chen et al. 2011). Sin embargo, nunca ha sido utilizada en humanos debido a que ha sido demostrada su alta toxicidad en varios estudios en mamíferos (Naujokat and Steinhart 2012), a diferencia del compuesto FMM212eF3 que no mostró efectos tóxicos en ratones (Morales, Ramírez et al.2015, en revisión).

La aplicación de marcadores fluorescentes es una técnica que permite determinar el mecanismo de acción de un fármaco en el interior celular y conocer su distribución en tejidos y órganos. La técnica de la fluorescencia constituye una herramienta útil para el estudio de estos aspectos tanto a nivel celular como tisular (White and Errington 2005). El conocimiento de la distribución de los fármacos es crucial para el diseño de agentes más selectivos y eficaces en la terapia del cáncer. En nuestro estudio, el compuesto FMM212-DANSYL-N9 parece ser incorporado mediante un proceso endocítico, seguido de un transporte mediante vesículas a través del citoplasma celular. Estas vesículas parecían acumularse en el aparato de Golgi, cerca del núcleo, y a las 4 horas, dentro del núcleo. Además, como se demostró previamente, el compuesto FMM212-DANSYL-N9 se distribuye sistémicamente, acumulándose en hígado y riñones principalmente, órganos asociados con el metabolismo de fármacos y excreción, respectivamente (Morales, Ramírez et al.2015, en revisión)

En conclusión, nuestros resultados muestran que las células cancerígenas en cultivo poseen una subpoblación con baja adherencia, la cual tiene propiedades de CSCs y una alta capacidad tumorigénica y metastásica. Nosotros hemos demostrado que el método de tripsinización diferencial que hemos desarrollado es una técnica no agresiva, fácil, barata y reproducible para aislar células con características de CSCs. Dicha metodología es de gran utilidad para posteriores estudios biológicos y ensayos terapéuticos dirigidos frente a CSCs, entre los que se encuentran el estudio de nuevos fármacos y otro tipo de terapias, como la inhibición de miRs específicos de CSCs vehiculizados por nanopartículas.

CONCLUSIONS

1. Established cancer cell lines possess low adherent cell subpopulations with CSCs-related phenotypic and functional properties, overexpressing characteristic genes of EMT process.
2. Low adherent cell subpopulations have both high tumor-initiating and metastatic abilities.
3. Differential trypsinization is a non-aggressive, easy, cheap and reproducible methodology to prospectively isolate breast and colon CSCs-enriched subpopulations.
4. Bioinformatic predictions are useful tools to identify new miRs related to stemness properties.
5. Validation of small RNA normalizers is required for each experiment and cell lineage analysis, especially for miRs related to CSCs studies.
6. Naked polyethylene NPs do not affect cell cycle, apoptosis, ALDH activity and miR-21-5p expression in melanoma cancer cells and, therefore, they are useful systems to perform anti-miRs strategies.
7. Anti-miR-21-5p loaded NPs affect melanosphere formation, encouraging further studies to determine its therapeutic efficacy.
8. *p*-Nitrobenzenesulfonamides compounds have potent antiproliferative effects against CSCs.
9. The fluorescent *N9* dicholopurine derivative is transported to cell cytoplasm and incorporated inside nuclei. These findings suggest its use to conduct single-cell imaging of this drug in differentiated bulk tumor cells and CSCs.

REFERENCIAS

- (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours." Nature **490**(7418): 61-70.
- Aaltonen, L. A., S. R. Hamilton, et al. (2000). Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon Oxford, IARC Press ;Oxford University Press.
- Ajani, J. A., S. Song, et al. (2015). "Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential." Semin Oncol **42 Suppl 1**: S3-S17.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Alexander, L. M., S. Pernagallo, et al. (2010). "Investigation of microsphere-mediated cellular delivery by chemical, microscopic and gene expression analysis." Mol Biosyst **6**(2): 399-409.
- Alvarez, P., J. A. Marchal, et al. (2012). "5-Fluorouracil derivatives: a patent review." Expert Opin Ther Pat **22**(2): 107-123.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." Cancer Res **64**(15): 5245-5250.
- Anderson, K. N., R. B. Schwab, et al. (2014). "Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature." Breast Cancer Res Treat **144**(1): 1-10.
- Anderson, W. F., P. S. Rosenberg, et al. (2014). "How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?" J Natl Cancer Inst **106**(8).
- Antonucci, L. A., J. V. Egger, et al. (2014). "Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax." Cell Cycle **13**(22): 3611-3617.
- Appaiah, H. N., C. P. Goswami, et al. (2011). "Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients." Breast Cancer Res **13**(5): R86.
- Asangani, I. A., S. A. Rasheed, et al. (2008). "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer." Oncogene **27**(15): 2128-2136.

- Azzam, D. J., D. Zhao, et al. (2013). "Triple negative breast cancer initiating cell subsets differ in functional and molecular characteristics and in gamma-secretase inhibitor drug responses." EMBO Mol Med **5**(10): 1502-1522.
- Babar, I. A., C. J. Cheng, et al. (2012). "Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(26): E1695-1704.
- Bai, R., H. Zhao, et al. (2014). "Characterization of sonic hedgehog inhibition in gastric carcinoma cells." Oncol Lett **7**(5): 1381-1384.
- Balbous, A., B. Renoux, et al. (2014). "Selective release of a cyclophamide glucuronide prodrug toward stem-like cancer cell inhibition in glioblastoma." Mol Cancer Ther **13**(9): 2159-2169.
- Bastian, B. C. (2014). "The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia." Annu Rev Pathol **9**: 239-271.
- Bessonov, S., M. Anokhina, et al. (2008). "Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core." Nature **452**(7189): 846-850.
- Bhatia, S., S. S. Tykodi, et al. (2015). "Systemic Therapy of Metastatic Melanoma: On the Road to Cure." Oncology (Williston Park) **29**(2).
- Bitarte, N., E. Bandres, et al. (2011). "MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells." Stem Cells **29**(11): 1661-1671.
- Boffetta, P., M. Bobak, et al. (2014). "The Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES) project-design, population and data harmonization of a large-scale, international study." Eur J Epidemiol **29**(12): 929-936.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-191.
- Boiko, A. D., O. V. Razorenova, et al. (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." Nature **466**(7302): 133-137.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

- Bourguignon, L. Y., G. Wong, et al. (2012). "Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma." J Biol Chem **287**(39): 32800-32824.
- Boyle, P., B. Levin, et al. (2008). World cancer report 2008. Lyon Geneva, International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press.
- Brana, I., R. Berger, et al. (2014). "A parallel-arm phase I trial of the humanised anti-IGF-1R antibody dalotuzumab in combination with the AKT inhibitor MK-2206, the mTOR inhibitor ridaforolimus, or the NOTCH inhibitor MK-0752, in patients with advanced solid tumours." Br J Cancer **111**(10): 1932-1944.
- Britton, K. M., J. A. Kirby, et al. (2011). "Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis." Cancers (Basel) **3**(2): 2106-2130.
- Caba, O., M. Diaz-Gavilan, et al. (2011). "Anticancer activity and cDNA microarray studies of a (RS)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9H-purine, and an acyclic (RS)-O,N-acetalic 6-chloro-7H-purine." Eur J Med Chem **46**(9): 3802-3809.
- Caba, O., F. Rodriguez-Serrano, et al. (2012). "The selective cytotoxic activity in breast cancer cells by an anthranilic alcohol-derived acyclic 5-fluorouracil O,N-acetal is mediated by endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." Eur J Med Chem **50**: 376-382.
- Capaccione, K. M. and S. R. Pine (2013). "The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival." Carcinogenesis **34**(7): 1420-1430.
- Carlsson, J., G. Helenius, et al. (2010). "Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues." Cancer Genet Cytogenet **202**(2): 71-75.
- Carvajal, R. D., D. P. Lawrence, et al. (2015). "Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition." Clin Cancer Res.
- Catsburg, C., A. B. Miller, et al. (2014). "Active cigarette smoking and risk of breast cancer." Int J Cancer.

- Celestino, A. T., D. Levy, et al. (2015). "ABCB1, ABCC1, and LRP gene expressions are altered by LDL, HDL, and serum deprivation in a human doxorubicin-resistant uterine sarcoma cell line." Biochem Biophys Res Commun.
- Cervantes-Arias, A., L. Y. Pang, et al. (2013). "Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype." Vet Comp Oncol **11**(3): 169-184.
- Cogliano, V. J., R. Baan, et al. (2011). "Preventable exposures associated with human cancers." J Natl Cancer Inst **103**(24): 1827-1839.
- Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nat Rev Cancer **10**(1): 51-57.
- Conejo-Garcia, A., M. E. Garcia-Rubino, et al. (2011). "Synthesis and anticancer activity of (RS)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9H-purines." Eur J Med Chem **46**(9): 3795-3801.
- Conley, S. J., E. Gheordunescu, et al. (2012). "Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(8): 2784-2789.
- Cozzio, A., E. Passegue, et al. (2003). "Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors." Genes Dev **17**(24): 3029-3035.
- Cui, J., M. Shi, et al. (2013). "Regulation of EMT by KLF4 in gastrointestinal cancer." Curr Cancer Drug Targets **13**(9): 986-995.
- Cummings, B. S., G. R. Kinsey, et al. (2004). "Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells." J Pharmacol Exp Ther **310**(1): 126-134.
- Chaffer, C. L., I. Brueckmann, et al. (2011). "Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(19): 7950-7955.
- Chai, F., J. Zhou, et al. (2013). "The Hedgehog inhibitor cyclopamine antagonizes chemoresistance of breast cancer cells." Onco Targets Ther **6**: 1643-1647.
- Chan, J. A., A. M. Krichevsky, et al. (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." Cancer Res **65**(14): 6029-6033.

- Chen, W. Y., B. Rosner, et al. (2011). "Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk." JAMA **306**(17): 1884-1890.
- Chen, X. P., Y. G. Chen, et al. (2014). "MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG." Cancer Lett **353**(2): 201-210.
- Chowdhury, P., G. E. Lin, et al. (2014). "Targeting TopBP1 at a convergent point of multiple oncogenic pathways for cancer therapy." Nat Commun **5**: 5476.
- Chu, Y., Y. Ouyang, et al. (2014). "MicroRNA-590 promotes cervical cancer cell growth and invasion by targeting CHL1." J Cell Biochem **115**(5): 847-853.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." Annu Rev Med **58**: 267-284.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10158-10163.
- Dantas-Barbosa, C., G. Bergthold, et al. (2015). "Inhibition of the NOTCH pathway using gamma-secretase inhibitor RO4929097 has limited antitumor activity in established glial tumors." Anticancer Drugs **26**(3): 272-283.
- de Antonellis, P., C. Medaglia, et al. (2011). "MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma." PLoS One **6**(9): e24584.
- De Jesus-Acosta, A., D. Laheru, et al. (2014). "A phase II study of the gamma secretase inhibitor RO4929097 in patients with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma." Invest New Drugs **32**(4): 739-745.
- Deng, L., L. Shang, et al. (2014). "MicroRNA100 inhibits self-renewal of breast cancer stem-like cells and breast tumor development." Cancer Res **74**(22): 6648-6660.
- DeSantis, C. E., C. C. Lin, et al. (2014). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2014." CA Cancer J Clin **64**(4): 252-271.

- Devulapally, R. and R. Paulmurugan (2014). "Polymer nanoparticles for drug and small silencing RNA delivery to treat cancers of different phenotypes." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **6**(1): 40-60.
- Devulapally, R., N. M. Sekar, et al. (2015). "Polymer Nanoparticles Mediated Co-Delivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for Achieving Triple Negative Breast Cancer Therapy." ACS Nano.
- Devulapally, R., N. M. Sekar, et al. (2015). "Polymer Nanoparticles Mediated Codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for Achieving Triple Negative Breast Cancer Therapy." ACS Nano.
- Dey, D., M. Saxena, et al. (2009). "Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture." PLoS One **4**(4): e5329.
- Diaz-Gavilan, M., J. A. Gomez-Vidal, et al. (2008). "Anticancer activity of (1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-pyrimidines and -purines against the MCF-7 cell line: Preliminary cDNA microarray studies." Bioorg Med Chem Lett **18**(4): 1457-1460.
- Dolle, L., N. D. Theise, et al. (2015). "EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **308**(4): G233-G250.
- Economopoulou, P., V. G. Kaklamani, et al. (2012). "The role of cancer stem cells in breast cancer initiation and progression: potential cancer stem cell-directed therapies." Oncologist **17**(11): 1394-1401.
- Espinoza, I. and L. Miele (2013). "Notch inhibitors for cancer treatment." Pharmacol Ther **139**(2): 95-110.
- Esplin, E. D. and M. P. Snyder (2014). "Genomic era diagnosis and management of hereditary and sporadic colon cancer." World J Clin Oncol **5**(5): 1036-1047.
- Fang, D., T. K. Nguyen, et al. (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." Cancer Res **65**(20): 9328-9337.
- Ferlay, J., H. R. Shin, et al. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.

- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- Flaherty, K. T., C. Robert, et al. (2012). "Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma." N Engl J Med **367**(2): 107-114.
- Frampton, A. E., J. Krell, et al. (2014). "miR-15b and miR-17 Are Tumor-Derived Plasma MicroRNAs Dysregulated in Colorectal Neoplasia." Ann Surg.
- Friedenreich, C. M., S. MacLaughlin, et al. (2014). "Study design and methods for the Breast Cancer and Exercise Trial in Alberta (BETA)." BMC Cancer **14**(1): 919.
- Gammon, L., A. Biddle, et al. (2013). "Sub-sets of cancer stem cells differ intrinsically in their patterns of oxygen metabolism." PLoS One **8**(4): e62493.
- Garcia-Posadas, L., I. Arranz-Valsero, et al. (2013). "A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(10): 7143-7152.
- Garcia, D. M., D. Baek, et al. (2011). "Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs." Nat Struct Mol Biol **18**(10): 1139-1146.
- Garofalo, M. and C. M. Croce (2015). "Role of microRNAs in maintaining cancer stem cells." Adv Drug Deliv Rev **81C**: 53-61.
- Genovesi, L. A., D. Anderson, et al. (2012). "Identification of suitable endogenous control genes for microRNA expression profiling of childhood medulloblastoma and human neural stem cells." BMC Res Notes **5**: 507.
- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Giraldez, M. D., J. J. Lozano, et al. (2013). "Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study." Clin Gastroenterol Hepatol **11**(6): 681-688 e683.
- Goldhirsch, A., E. P. Winer, et al. (2013). "Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International

- Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013." Ann Oncol **24**(9): 2206-2223.
- Gonnissen, A., S. Isebaert, et al. (2013). "Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication." Int J Mol Sci **14**(7): 13979-14007.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-240.
- Grignol, V., E. T. Fairchild, et al. (2011). "miR-21 and miR-155 are associated with mitotic activity and lesion depth of borderline melanocytic lesions." Br J Cancer **105**(7): 1023-1029.
- Gupta, P. B., T. T. Onder, et al. (2009). "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening." Cell **138**(4): 645-659.
- Gustavsson, B., G. Carlsson, et al. (2015). "A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer." Clin Colorectal Cancer **14**(1): 1-10.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Haraguchi, N., H. Inoue, et al. (2006). "Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers." Hum Cell **19**(1): 24-29.
- He, S., S. Zeng, et al. (2015). "Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication." Drug Des Devel Ther **9**: 1103-1175.
- Hegde, M., M. Ferber, et al. (2014). "ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis)." Genet Med **16**(1): 101-116.
- Heidelberger, C., N. K. Chaudhuri, et al. (1957). "Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds." Nature **179**(4561): 663-666.
- Heiden, K. B., A. J. Williamson, et al. (2014). "The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression." J Clin Endocrinol Metab **99**(11): E2178-2187.

- Held, M. A., D. P. Curley, et al. (2010). "Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell." Cancer Res **70**(1): 388-397.
- Hermann, P. C., S. Bhaskar, et al. (2010). "Cancer stem cells in solid tumors." Semin Cancer Biol **20**(2): 77-84.
- Herzig, D. O. and V. L. Tsikitis (2015). "Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy." J Surg Oncol **111**(1): 96-102.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.
- Hu, X., J. Cao, et al. (2014). "Multicenter phase II study of apatinib in non-triple-negative metastatic breast cancer." BMC Cancer **14**: 820.
- Huang, E. H., M. J. Hynes, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis." Cancer Res **69**(8): 3382-3389.
- Isobe, T., S. Hisamori, et al. (2014). "miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway." Elife **3**.
- Isoda, T., Y. Nakatsu, et al. (2014). "Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice." Int J Biol Sci **10**(8): 940-947.
- Iwase, H. and Y. Yamamoto (2015). "Clinical benefit of sequential use of endocrine therapies for metastatic breast cancer." Int J Clin Oncol.
- Jackson, B., C. Brocker, et al. (2011). "Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily." Hum Genomics **5**(4): 283-303.
- Jass, J. R. (2007). "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." Histopathology **50**(1): 113-130.
- Ji, J., T. Yamashita, et al. (2009). "Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells." Hepatology **50**(2): 472-480.
- Jiang, X., G. Xiang, et al. (2012). "MicroRNA-590-5p regulates proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma cells by targeting TGF-beta RII." Mol Cells **33**(6): 545-551.

- Jin, H., Y. Yu, et al. (2012). "Delivery of MicroRNA-10b with Polylysine Nanoparticles for Inhibition of Breast Cancer Cell Wound Healing." Breast Cancer (Auckl) **6**: 9-19.
- Joseph, E. W., C. A. Pratilas, et al. (2010). "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(33): 14903-14908.
- Kaneda, A. and K. Yagi (2011). "Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes." Cancer Sci **102**(1): 18-24.
- Kang, H. Y. (2013). "MicroRNA-21 regulates stemness in cancer cells." Stem Cell Res Ther **4**(5): 110.
- Kanwar, S. S., Y. Yu, et al. (2010). "The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres." Mol Cancer **9**: 212.
- Kasinski, A. L. and F. J. Slack (2012). "miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma." Cancer Res **72**(21): 5576-5587.
- Kayama, M., M. S. Kurokawa, et al. (2007). "Recent advances in corneal regeneration and possible application of embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells." Clin Ophthalmol **1**(4): 373-382.
- Kim, E. J., V. Sahai, et al. (2014). "Pilot clinical trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 (vismodegib) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma." Clin Cancer Res **20**(23): 5937-5945.
- Kim, M. H. and H. Kim (2013). "Oncogenes and tumor suppressors regulate glutamine metabolism in cancer cells." J Cancer Prev **18**(3): 221-226.
- Kim, Y., Q. Lin, et al. (2009). "Hypoxia-regulated delta-like 1 homologue enhances cancer cell stemness and tumorigenicity." Cancer Res **69**(24): 9271-9280.
- Kinose, Y., K. Sawada, et al. (2014). "The role of microRNAs in ovarian cancer." Biomed Res Int **2014**: 249393.
- Koch, U., M. Krause, et al. (2010). "Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective." Semin Cancer Biol **20**(2): 116-124.

- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Leal, J. A. and M. E. Leonart (2013). "MicroRNAs and cancer stem cells: therapeutic approaches and future perspectives." Cancer Lett **338**(1): 174-183.
- LeBoit, P. E., International Academy of Pathology., et al. (2006). Pathology and genetics of skin tumours. Lyon, IARC Press.
- Lee, H. G., J. M. Lee, et al. (2014). "Salinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human uterine leiomyoma cells." Obstet Gynecol Sci **57**(6): 501-506.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, S. M., J. Moon, et al. (2015). "Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933." Cancer **121**(3): 432-440.
- Li, Y., K. B. Challagundla, et al. (2014). "MicroRNA-130a associates with ribosomal protein L11 to suppress c-Myc expression in response to UV irradiation." Oncotarget.
- Li, Y., Z. Xu, et al. (2014). "Epigenetic silencing of miRNA-9 is correlated with promoter-proximal CpG island hypermethylation in gastric cancer in vitro and in vivo." Int J Oncol **45**(6): 2576-2586.
- Li, Z., S. Bao, et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell **15**(6): 501-513.
- Ling, Y., X. Zhao, et al. (2014). "Novel FTS-diamine/cinnamic acid hybrids inhibit tumor cell proliferation and migration and promote apoptosis via blocking Ras-related signaling in vitro." Cancer Chemother Pharmacol.
- Linnekamp, J. F., X. Wang, et al. (2015). "Colorectal Cancer Heterogeneity and Targeted Therapy: A Case for Molecular Disease Subtypes." Cancer Res **75**(2): 245-249.
- Liu, A., X. Yu, et al. (2013). "Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference." Chin J Cancer **32**(9): 483-487.

- Liu, A. M., T. J. Yao, et al. (2012). "Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study." BMJ Open **2**(2): e000825.
- Liu, C., K. Kelnar, et al. (2011). "The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44." Nat Med **17**(2): 211-215.
- Liu, H. G., C. Chen, et al. (2011). "Cancer stem cell subsets and their relationships." J Transl Med **9**: 50.
- Liu, J., H. Zhu, et al. (2014). "MicroRNA-21 is a novel promising target in cancer radiation therapy." Tumour Biol **35**(5): 3975-3979.
- Liu, L., W. Zhou, et al. (2014). "TGFbeta induces "BRCAness" and sensitivity to PARP inhibition in breast cancer by regulating DNA-repair genes." Mol Cancer Res **12**(11): 1597-1609.
- Liu, S., S. G. Clouthier, et al. (2012). "Role of microRNAs in the regulation of breast cancer stem cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia **17**(1): 15-21.
- Liu, S., G. Dontu, et al. (2006). "Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells." Cancer Res **66**(12): 6063-6071.
- Liu, X. and D. Fan (2014). "The Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: Functional and Mechanistic Links." Curr Pharm Des.
- Lo, J. A. and D. E. Fisher (2014). "The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics." Science **346**(6212): 945-949.
- LoConte, N. K., A. R. Razak, et al. (2015). "A multicenter phase 1 study of gamma -secretase inhibitor RO4929097 in combination with capecitabine in refractory solid tumors." Invest New Drugs **33**(1): 169-176.
- Loffler, D., K. Brocke-Heidrich, et al. (2007). "Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer." Blood **110**(4): 1330-1333.
- Lopez-Cara, L. C., A. Conejo-Garcia, et al. (2011). "New (RS)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (RS)-2,6-dichloro-

- 9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazep in-3-yl]-9H-purine." Eur J Med Chem **46**(1): 249-258.
- Lorico, A. and G. Rappa (2011). "Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells." J Oncol **2011**: 135039.
- Louandre, C., I. Marcq, et al. (2015). "The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells." Cancer Lett **356**(2 Pt B): 971-977.
- Lu, J., G. Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature **435**(7043): 834-838.
- Lu, W. and Y. Li (2014). "Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells." J Cell Biochem **115**(10): 1799-1807.
- Lv, J., K. Xia, et al. (2014). "miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues." Biomed Pharmacother **68**(8): 935-942.
- Lv, M., X. Zhang, et al. (2012). "An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways." Leukemia **26**(4): 769-777.
- Magnoni, C., S. Giudice, et al. (2014). "Stem cell properties in cell cultures from different stage of melanoma progression." Appl Immunohistochem Mol Morphol **22**(3): 171-181.
- Malaguarnera, R. and A. Belfiore (2014). "The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells." Front Endocrinol (Lausanne) **5**: 10.
- Mallini, P., T. Lennard, et al. (2014). "Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance." Cancer Treat Rev **40**(3): 341-348.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-715.
- Maroof, H., A. Salajegheh, et al. (2014). "Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis." Exp Mol Pathol **97**(2): 298-304.
- Martin del Campo, S. E., N. Latchana, et al. (2015). "MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of

- metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR-21 inhibitor." PLoS One **10**(1): e0115919.
- Meng, F., R. Henson, et al. (2006). "Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines." Gastroenterology **130**(7): 2113-2129.
- Metcalfe, K., J. Lubinski, et al. (2010). "Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations." J Natl Cancer Inst **102**(24): 1874-1878.
- Michailidou, K., P. Hall, et al. (2013). "Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk." Nat Genet **45**(4): 353-361, 361e351-352.
- Milane, L., S. Ganesh, et al. (2011). "Multi-modal strategies for overcoming tumor drug resistance: hypoxia, the Warburg effect, stem cells, and multifunctional nanotechnology." J Control Release **155**(2): 237-247.
- Mohamad, H. B. and J. P. Apffelstaedt (2008). "Counseling for male BRCA mutation carriers: a review." Breast **17**(5): 441-450.
- Monzani, E., F. Facchetti, et al. (2007). "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential." Eur J Cancer **43**(5): 935-946.
- Morales, F., A. Ramírez, et al. (2015). "p-Nitrobenzenesulfonamides and their Fluorescent Dansylsulfonamides derived from N-Alkylated o-(Purine-Methyl)Anilines as Novel Anti-cancer Agents." Chem Commun (En revisión).
- Morioka, T., T. Miyoshi-Imamura, et al. (2014). "Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mlh1-deficient mice." Cancer Sci.
- Mulligan, A. M., I. Raitman, et al. (2013). "Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry." Clin Cancer Res **19**(2): 336-346.
- Munoz, J. L., V. Rodriguez-Cruz, et al. (2014). "Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level." Oncotarget.

- Murakami, Y., T. Yasuda, et al. (2006). "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues." Oncogene **25**(17): 2537-2545.
- Natarajan, K., Y. Xie, et al. (2012). "Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance." Biochem Pharmacol **83**(8): 1084-1103.
- Naujokat, C. and R. Steinhart (2012). "Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells." J Biomed Biotechnol **2012**: 950658.
- Ni, C., P. Wu, et al. (2015). "Thymosin alpha1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression." Cancer Lett **356**(2 Pt B): 579-588.
- O'Brien, C. A., A. Kreso, et al. (2009). "Cancer stem cells in solid tumors: an overview." Semin Radiat Oncol **19**(2): 71-77.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.
- Olive, V., Q. Li, et al. (2013). "mir-17-92: a polycistronic oncomir with pleiotropic functions." Immunol Rev **253**(1): 158-166.
- Orian-Rousseau, V. (2010). "CD44, a therapeutic target for metastasising tumours." Eur J Cancer **46**(7): 1271-1277.
- Owens, R. B., H. S. Smith, et al. (1974). "Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice." J Natl Cancer Inst **53**(1): 261-269.
- Paranjape, A. N., S. A. Balaji, et al. (2014). "Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog." BMC Cancer **14**: 785.
- Park, E. Y., E. Chang, et al. (2014). "Targeting of miR34a-NOTCH1 Axis Reduced Breast Cancer Stemness and Chemoresistance." Cancer Res **74**(24): 7573-7582.
- Park, J. H., H. Y. Kwon, et al. (2013). "Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells." Pharmacol Rep **65**(5): 1366-1374.
- Pearce, D. J., D. Taussig, et al. (2005). "Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples." Stem Cells **23**(6): 752-760.

- Pencheva, N. and S. F. Tavazoie (2013). "Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks." Nat Cell Biol **15**(6): 546-554.
- Petrelli, A., R. Carollo, et al. (2015). "By promoting cell differentiation, miR-100 sensitizes basal-like breast cancer stem cells to hormonal therapy." Oncotarget **6**(4): 2315-2330.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, et al. (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." Biotechnol Lett **26**(6): 509-515.
- Plati, J., O. Bucur, et al. (2011). "Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy." Integr Biol (Camb) **3**(4): 279-296.
- Poliseno, L., A. Haimovic, et al. (2012). "Histology-specific microRNA alterations in melanoma." J Invest Dermatol **132**(7): 1860-1868.
- Puglisi, M. A., A. Sgambato, et al. (2009). "Isolation and characterization of CD133+ cell population within human primary and metastatic colon cancer." Eur Rev Med Pharmacol Sci **13 Suppl 1**: 55-62.
- Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." Nat Med **19**(11): 1423-1437.
- Ramirez, A., H. Boulaiz, et al. (2014). "HER2-signaling pathway, JNK and ERKs kinases, and cancer stem-like cells are targets of Bozepinib small compound." Oncotarget **5**(11): 3590-3606.
- Rappa, G., J. Merlapide, et al. (2008). "Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets." Exp Cell Res **314**(10): 2110-2122.
- Rasheed, S. A., C. R. Teo, et al. (2015). "MicroRNA-31 controls G protein alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion in breast cancer cells." Mol Cancer **14**(1): 67.
- Redmer, T., Y. Welte, et al. (2014). "The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells." PLoS One **9**(5): e92596.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-906.

- Ress, A. L., V. Stiegelbauer, et al. (2014). "Spinophilin expression determines cellular growth, cancer stemness and 5-flourouracil resistance in colorectal cancer." Oncotarget **5**(18): 8492-8502.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Sabatier, R., P. Finetti, et al. (2014). "Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization." Mol Cancer **13**: 228.
- Saha, T., R. K. Kar, et al. (2014). "Structural and Sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence." Prog Biophys Mol Biol.
- Sanchez-Martin, R. M., M. Muzerelle, et al. (2005). "Bead-based cellular analysis, sorting and multiplexing." Chembiochem **6**(8): 1341-1345.
- Sasaki, K., J. R. Gotlib, et al. (2015). "Phase II evaluation of IPI-926, an oral Hedgehog inhibitor, in patients with myelofibrosis." Leuk Lymphoma: 1-6.
- Scolyer, R. A., G. V. Long, et al. (2011). "Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care." Mol Oncol **5**(2): 124-136.
- Schatton, T., G. F. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." Nature **451**(7176): 345-349.
- Schmidt, M. (2014). "Chemotherapy in early breast cancer: when, how and which one?" Breast Care (Basel) **9**(3): 154-160.
- Schott, A. F., M. D. Landis, et al. (2013). "Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors." Clin Cancer Res **19**(6): 1512-1524.
- Shackleton, M. (2010). "Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different." Semin Cancer Biol **20**(2): 85-92.
- Sherman, S. K., J. E. Maxwell, et al. (2014). "Esophageal cancer in a family with hamartomatous tumors and germline PTEN frameshift and SMAD7 missense mutations." Cancer Genet.
- Shigdar, S., Y. Li, et al. (2014). "Inflammation and cancer stem cells." Cancer Lett **345**(2): 271-278.

- Shigeishi, H., A. Biddle, et al. (2013). "Maintenance of stem cell self-renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3beta influenced by CD44 and RHAMM." Stem Cells **31**(10): 2073-2083.
- Shiyyama, R., S. Fukushima, et al. (2013). "Sensitive detection of melanoma metastasis using circulating microRNA expression profiles." Melanoma Res.
- Silver, N., S. Best, et al. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." BMC Mol Biol **7**: 33.
- Smalley, M. and A. Ashworth (2003). "Stem cells and breast cancer: A field in transit." Nat Rev Cancer **3**(11): 832-844.
- Song, S. J., K. Ito, et al. (2013). "The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation." Cell Stem Cell **13**(1): 87-101.
- Sonnenschein, C. and A. M. Soto (2013). "The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique." J Biosci **38**(3): 651-663.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.
- Stintzing, S. (2014). "Management of colorectal cancer." F1000Prime Rep **6**: 108.
- Sun, B., N. Yang, et al. (2015). "Antagomir-1290 suppresses CD133 cells in non-small cell lung cancer by targeting fyn-related Src family tyrosine kinase." Tumour Biol.
- Takahashi, H., H. Ishii, et al. (2011). "Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum." Ann Surg Oncol **18**(4): 1166-1174.
- Takebe, N., P. J. Harris, et al. (2011). "Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways." Nat Rev Clin Oncol **8**(2): 97-106.
- Tam, W. L., H. Lu, et al. (2013). "Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells." Cancer Cell **24**(3): 347-364.
- Tang, G., X. Shen, et al. (2015). "Different Normalization Strategies Might Cause Inconsistent Variation in Circulating microRNAs in Patients with Hepatocellular Carcinoma." Med Sci Monit **21**: 617-624.

- Tirino, V., V. Desiderio, et al. (2013). "Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization." FASEB J **27**(1): 13-24.
- Tiwari, A. K., K. Sodani, et al. (2009). "Nilotinib (AMN107, Tasisa) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters." Biochem Pharmacol **78**(2): 153-161.
- Torres, A., K. Torres, et al. (2013). "Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues." Gynecol Oncol **130**(3): 588-594.
- Tsai, J., J. T. Lee, et al. (2008). "Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3041-3046.
- Tsakiridis, A., L. M. Alexander, et al. (2009). "Microsphere-based tracing and molecular delivery in embryonic stem cells." Biomaterials **30**(29): 5853-5861.
- Ul-Hussain, M. (2012). "Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action." Cell Tissue Res **349**(2): 405-413.
- Unciti-Broceta, A., E. M. Johansson, et al. (2012). "Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd(0) nanoparticles to perform bioorthogonal organometallic chemistry in living cells." Nat Protoc **7**(6): 1207-1218.
- Vidigal, J. A. and A. Ventura (2012). "Embryonic stem cell miRNAs and their roles in development and disease." Semin Cancer Biol **22**(5-6): 428-436.
- Viprey, V. F., M. V. Corrias, et al. (2012). "Identification of reference microRNAs and suitability of archived hemopoietic samples for robust microRNA expression profiling." Anal Biochem **421**(2): 566-572.
- Visvader, J. E. (2011). "Cells of origin in cancer." Nature **469**(7330): 314-322.
- Walia, V. and R. C. Elble (2010). "Enrichment for breast cancer cells with stem/progenitor properties by differential adhesion." Stem Cells Dev **19**(8): 1175-1182.
- Wang, C., Z. Chen, et al. (2014). "Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by miRNAs and its implications in bladder cancer cells." FEBS Lett **588**(24): 4654-4664.

- Wang, D., P. Lu, et al. (2014). "Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients." Oncotarget **5**(21): 10803-10815.
- Wang, Q., Y. Zhao, et al. (2015). "Down-Regulation of MicroRNA-223 Promotes Degranulation via the PI3K/Akt Pathway by Targeting IGF-1R in Mast Cells." PLoS One **10**(4): e0123575.
- White, N. S. and R. J. Errington (2005). "Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice." Adv Drug Deliv Rev **57**(1): 17-42.
- Winter, J., S. Jung, et al. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-234.
- Wotschofsky, Z., H. A. Meyer, et al. (2011). "Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases." Anal Biochem **417**(2): 233-241.
- Xiao, X., C. Tang, et al. (2013). "Enhancement of proliferation and invasion by MicroRNA-590-5p via targeting PBRM1 in clear cell renal carcinoma cells." Oncol Res **20**(11): 537-544.
- Xiong, A., W. Yu, et al. (2015). "Elimination of ALDH+ Breast Tumor Initiating Cells by Docosahexanoic Acid and/or Gamma Tocotrienol Through SHP-1 Inhibition of STAT3 Signaling." Mol Carcinog.
- Xu, J., J. R. Prosperi, et al. (2015). "beta-Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells." PLoS One **10**(2): e0117097.
- Xu, W., H. Huang, et al. (2015). "Meta-analysis of gene expression profiles indicates genes in spliceosome pathway are up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC)." Med Oncol **32**(4): 425.
- Xu, W., J. Ji, et al. (2014). "MicroRNA-191, by promoting the EMT and increasing CSC-like properties, is involved in neoplastic and metastatic properties of transformed human bronchial epithelial cells." Mol Carcinog.
- Xue, Z., J. Zheng, et al. (2014). "Latexin inhibits the proliferation of CD133+ miapaca-2 pancreatic cancer stem-like cells." World J Surg Oncol **12**(1): 404.

- Yang, C. H., S. R. Pfeffer, et al. (2015). "The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis." J Biol Chem.
- Yang, O., J. Huang, et al. (2014). "Regulatory effects of miRNA on gastric cancer cells." Oncol Lett **8**(2): 651-656.
- Yang, X. R., J. Chang-Claude, et al. (2011). "Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies." J Natl Cancer Inst **103**(3): 250-263.
- Yang, Y., W. Sun, et al. (2015). "Wnt antagonist, secreted frizzled-related protein 1, is involved in prenatal skeletal muscle development and is a target of miRNA-1/206 in pigs." BMC Mol Biol **16**(1): 4.
- Yang, Y. P., Y. Chien, et al. (2012). "Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI." Biomaterials **33**(5): 1462-1476.
- Ye, X., C. Zhang, et al. (2015). "Upregulation of Acetylcholinesterase Mediated by p53 Contributes to Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell." J Cancer **6**(1): 48-53.
- Yersal, O. and S. Barutca (2014). "Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications." World J Clin Oncol **5**(3): 412-424.
- Yin, G., R. Chen, et al. (2010). "TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214." Oncogene **29**(24): 3545-3553.
- Ying, J., M. Tsujii, et al. (2015). "The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells." Int J Oncol.
- Yu, F., Y. Jiao, et al. (2012). "MicroRNA 34c gene down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells." J Biol Chem **287**(1): 465-473.
- Yu, Z., T. G. Pestell, et al. (2012). "Cancer stem cells." Int J Biochem Cell Biol **44**(12): 2144-2151.

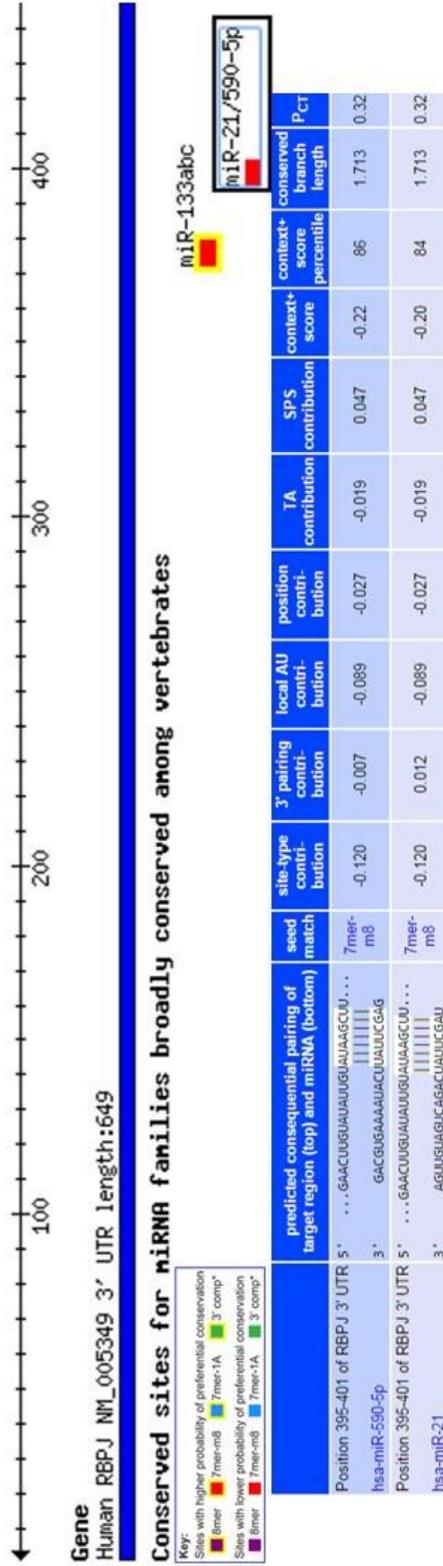
- Yungang, W., L. Xiaoyu, et al. (2014). "miR-370 targeted FoxM1 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)." Biomed Pharmacother **68**(2): 149-154.
- Zhang, H. H., G. L. Gu, et al. (2015). "Primary analysis and screening of microRNAs in gastric cancer side population cells." World J Gastroenterol **21**(12): 3519-3526.
- Zhang, J., N. Luo, et al. (2012). "microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb." Int J Oncol **40**(3): 747-756.
- Zhang, L., Y. Xia, et al. (2012). "Cancer stem cell-like cells exist in mucoepidermoid carcinoma cell line MC3." Oncol Res **20**(12): 589-600.
- Zhang, Z., H. Zhang, et al. (2014). "Selective expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated by microRNA suppresses renal carcinoma growth." Mol Cell Biochem **392**(1-2): 125-134.
- Zhao, D., C. Pan, et al. (2014). "VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2." Oncogene.
- Zheng, M., Y. P. Jiang, et al. (2015). "Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma." Oncotarget.
- Zhi, Q. M., X. H. Chen, et al. (2011). "Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer." Biomed Pharmacother **65**(7): 509-515.
- Zhu, Z., Z. Qian, et al. (2013). "A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors." Int J Nanomedicine **8**: 129-136.

APÉNDICE

I. PREDICCIONES BIOINFORMÁTICAS DE LOS MICRORNAs SELECCIONADOS

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea RBPJ con los programas A) TargetScan 6.0. v B) miRanda-miRSVR.

A Human RBPJ 3' UTR



B

Displayed miRNAs ordered by sum of miRSVR scores:

miRNA	miRSVR score	PhastCons score
hsa-miR-137 1760		
hsa-miR-15b 329 1135		
hsa-miR-497 333 1139	mirSVR score: -0.9352	PhastCons score: 0.5981
hsa-miR-15a 333 1135		
hsa-miR-424 327 1137		
hsa-miR-240 1087 1797		
hsa-miR-16 331 1138		
hsa-miR-195 332 1139		
hsa-miR-361-5p 1453	mirSVR score: -0.9176	PhastCons score: 0.5414
hsa-miR-144 580		
hsa-miR-21 129		
hsa-miR-590-5p 128		

hsa-miR-15b/RBPJ Alignment

```

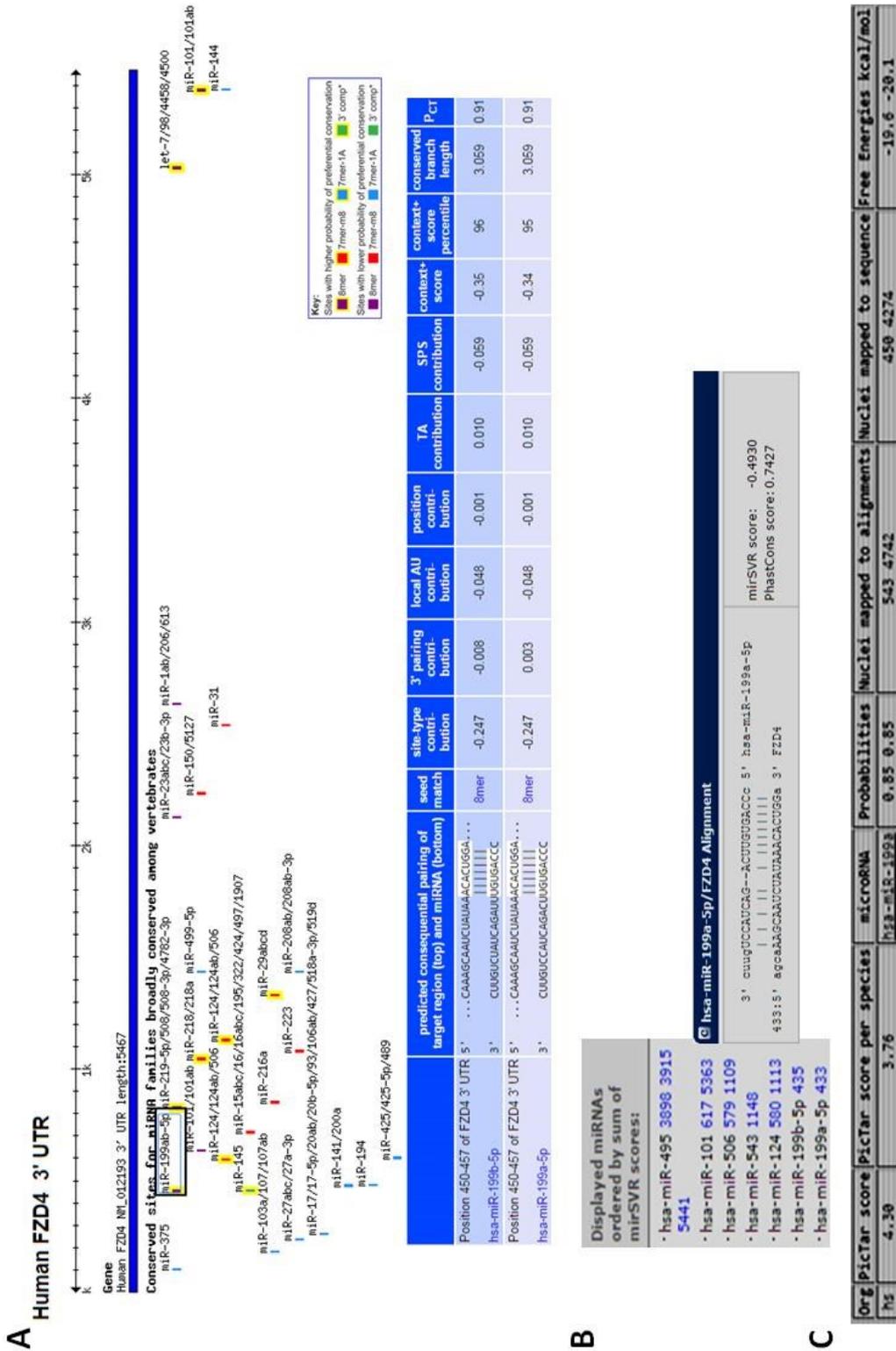
3' acAUUUGUA---CUACAGCGAG 5' hsa-miR-15b
  |||:| | | | | | | | |
1135:5' aGUAACUAUCUAAAUAUUUCGUC 3' RBPJ
  
```

hsa-miR-590-5p/RBPJ Alignment

```

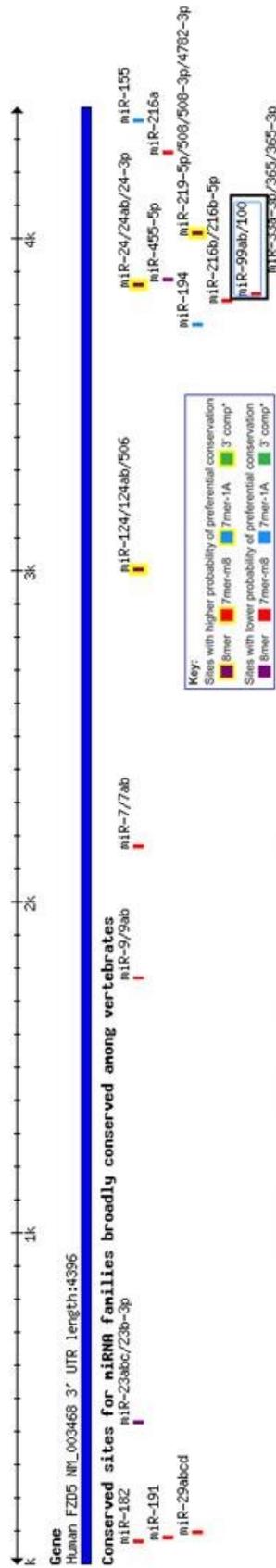
3' gacGUGAAAUA-CUUUUCGAG 5' hsa-miR-590-5p
  ||||| | | | | | | | |
128:5' acUCACUUCUCUUUAUAGCUA 3' RBPJ
  
```


Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea FZD4 con los programas A) TargetScan 6.0., B) miRanda-miRSVR y



Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea FZD5 con el programas TargetScan 6.0.

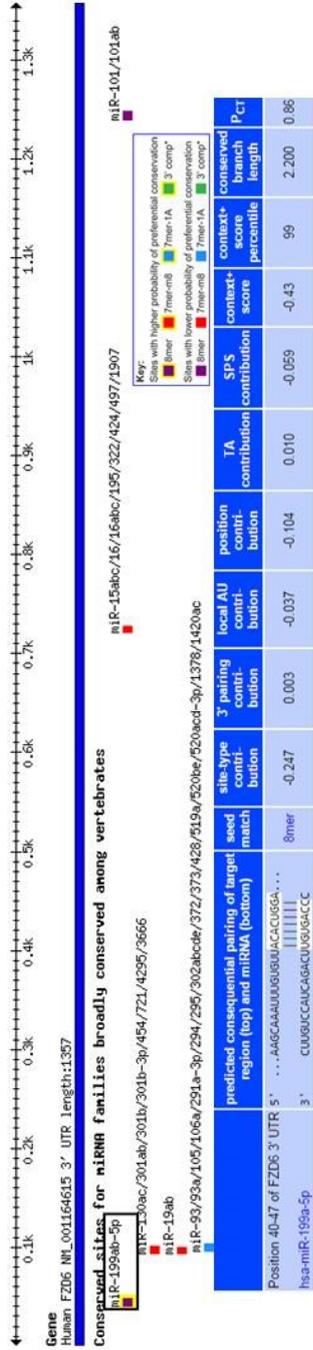
Human FZD5 3' UTR



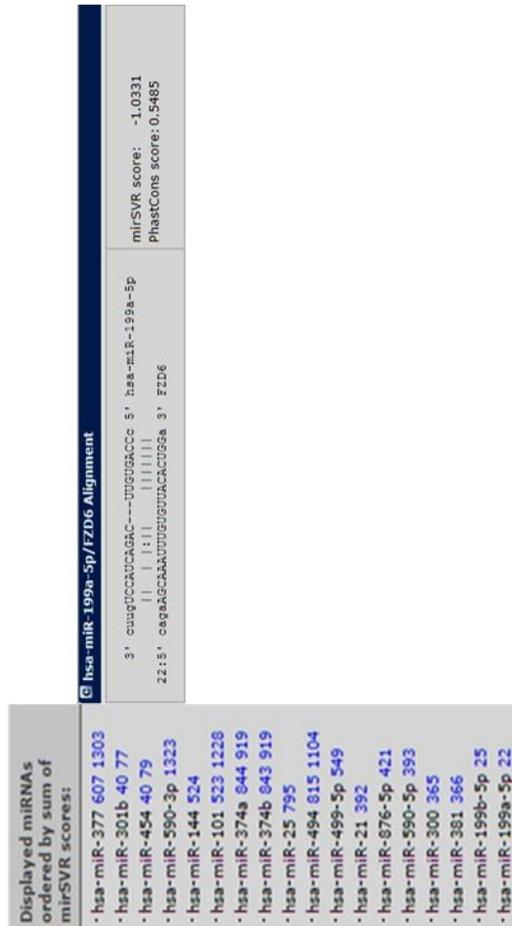
	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	PCT
Position 3831-3837 of FZD5 3' UTR	5' ...UUUGGUGACUUUUUAUACGGGU... 3' GCGUCCAGCCAAAGAUGCCAC	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.049	0.017	-0.116	-0.036	-0.30	76	3.100	< 0.1
hsa-miR-99b												
Position 3831-3837 of FZD5 3' UTR	5' ...UUUGGUGACUUUUUAUACGGGU... 3' GUGUCAAAGCCUAGAUGCCAA	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.049	0.017	-0.116	-0.036	-0.30	74	3.100	< 0.1
hsa-miR-100												
Position 3831-3837 of FZD5 3' UTR	5' ...UUUGGUGACUUUUUAUACGGGU... 3' GUGUCAAAGCCUAGAUGCCAA	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.049	0.017	-0.116	-0.036	-0.29	70	3.100	< 0.1
hsa-miR-99a												

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea FZD6 con los programas A) TargetScan 6.0., B) miRanda-miRSVR y C)

A Human FZD6 3' UTR



B

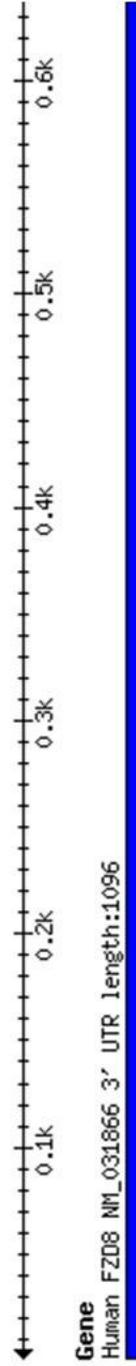


C

Org	Pictar score	miRanda score per species	miRanda	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
hs	6.48	3.65	hsa-miR-199a-5p	0.97	59	49	-18.5

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea FZD8 con los programas A) TargetScan 6.0., B) miRanda-miRSVR y C) PicTar.

A Human FZD8 3' UTR



Conserved sites for miRNA families broadly conserved among vertebrates

Key:
 Sites with higher probability of preferential conservation
 7mer-m8 7mer-1A 3' comp*
 Sites with lower probability of preferential conservation
 7mer-m8 7mer-1A 3' comp*

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P _{CT}
Position 544-550 of FZD8 3' UTR	5' ...UACACCCACGUAUAUACGGGU... 3' GGUUCCAGCCAAAGAUCCAC	7mer-m8 	-0.120	0.003	-0.089	0.015	-0.116	-0.036	-0.34	85	2.877	< 0.1
Position 544-550 of FZD8 3' UTR	5' ...UACACCCACGUAUAUACGGGU... 3' GUGUUAAGCCUAGAUCCCA	7mer-m8 	-0.120	0.003	-0.089	0.015	-0.116	-0.036	-0.34	85	2.877	< 0.1

B

Displayed miRNAs ordered by sum of miR-SVR scores:

- hsa-miR-100 530
- hsa-miR-99a 530
- hsa-miR-99b 530
- hsa-miR-18a 754 922
- hsa-miR-18b 752 922

hsa-miR-100/FZD8 Alignment

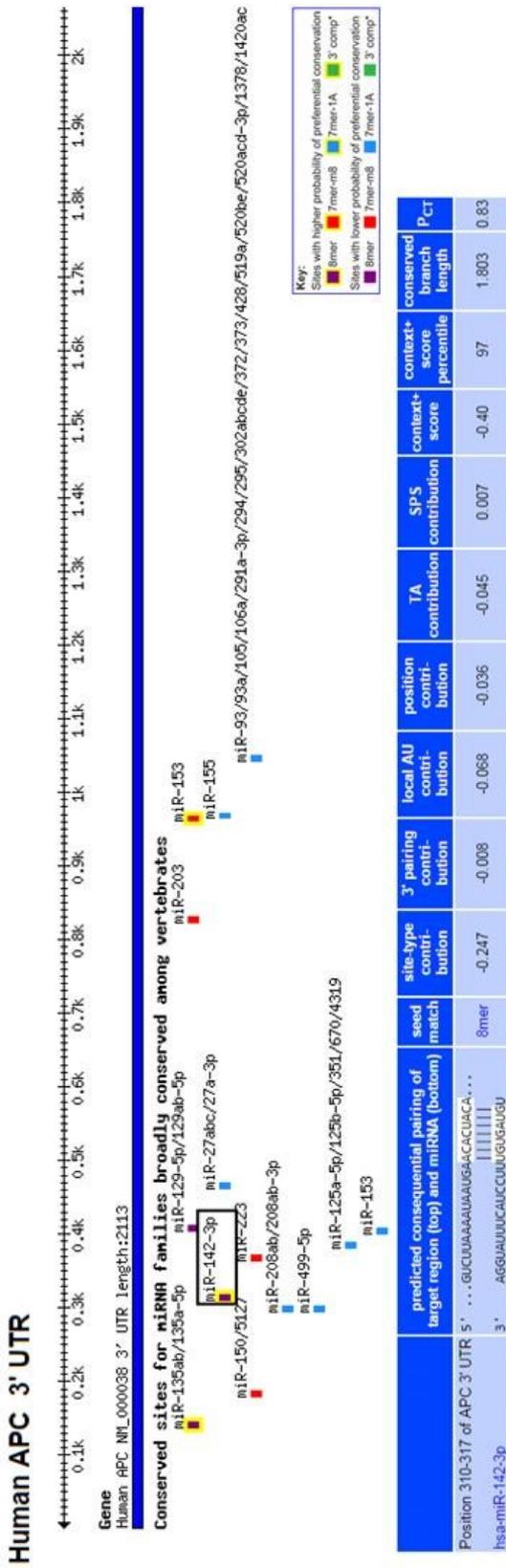
3' guuucaaacGUAGUCCCA 5' hsa-miR-100	miR-SVR score: -1.1406
53015' acacccacGUAAUACGGGU 3' FZD8	PhastCons score: 0.6677

C

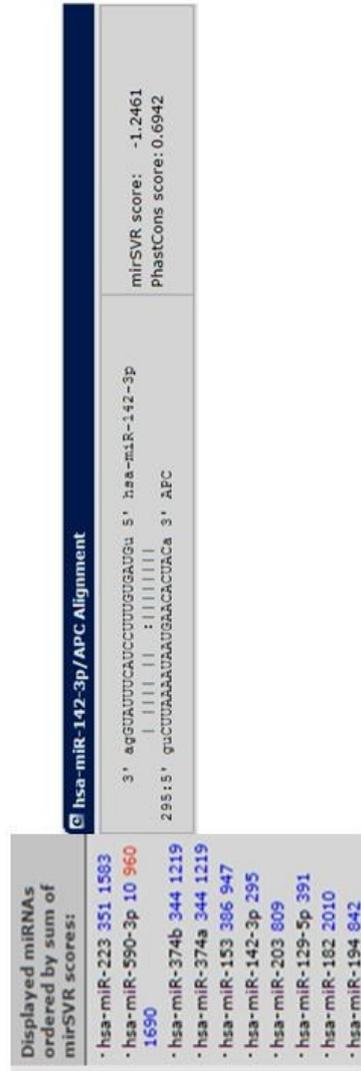
Org	picTar score	picTar score per species	microRNA	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
hs	2.71	2.52	hsa-miR-100	0.92	603	545	-18.4

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea APC con los programas A) TargetScan 6.0. y B) miRanda-miRSVR y C) PicTar.

A

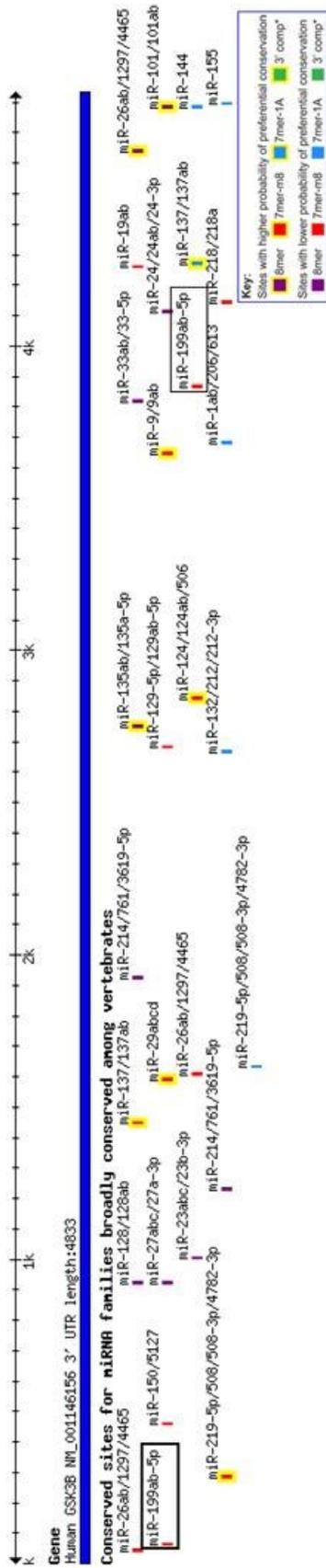


B



Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea GSK3β con los programas A) TargetScan 6.0. y B) PicTar.

A Human GSK3B 3' UTR



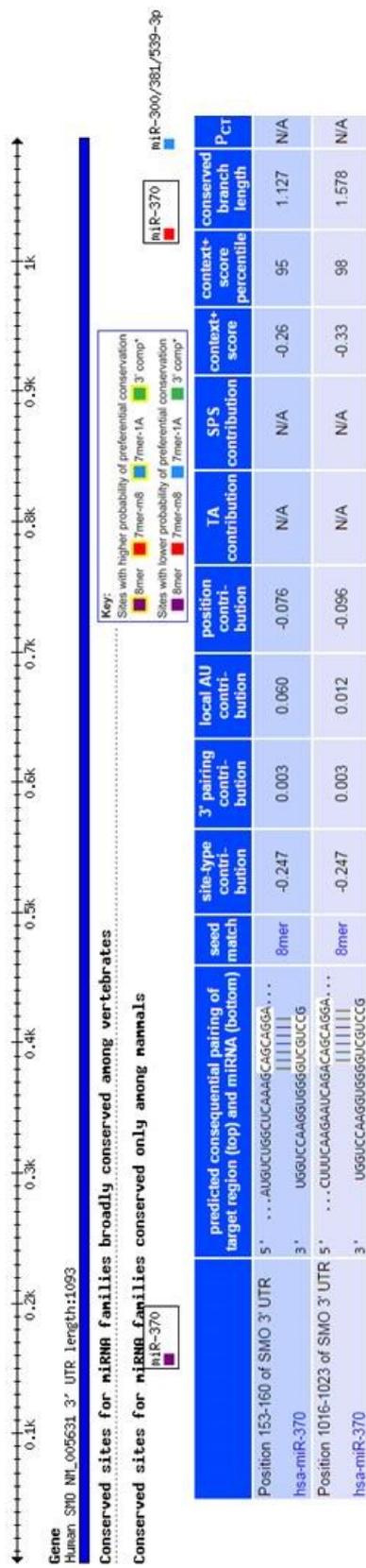
	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score percentile	conserved branch length	P CT
Position 61-67 of GSK3B 3' UTR	5' ...GAGUGUCACUCAGCAGACACUGGU... 3' CUUGUCCAUCAAGCUUGUGACCC	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.016	-0.053	0.005	-0.032	83	3.057	0.68
hsa-miR-199a-5p											
Position 61-67 of GSK3B 3' UTR	5' ...GAGUGUCACUCAGCAGACACUGGU... 3' CUUGUCCAUCAAGCUUGUGACCC	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.016	-0.053	0.005	-0.032	83	3.057	0.68
hsa-miR-199b-5p											
Position 3865-3871 of GSK3B 3' UTR	5' ...CCUGUGAUUAGAG-ACACUGGC... 3' CUUGUCCAUCAAGCUUGUGACCC	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.022	0.075	0.005	-0.032	50	1.751	0.43
hsa-miR-199b-5p											
Position 3865-3871 of GSK3B 3' UTR	5' ...CCUGUGAUUAGAG-ACACUGGC... 3' CUUGUCCAUCAAGCUUGUGACCC	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.022	0.075	0.005	-0.032	42	1.751	0.43
hsa-miR-199a-5p											

B

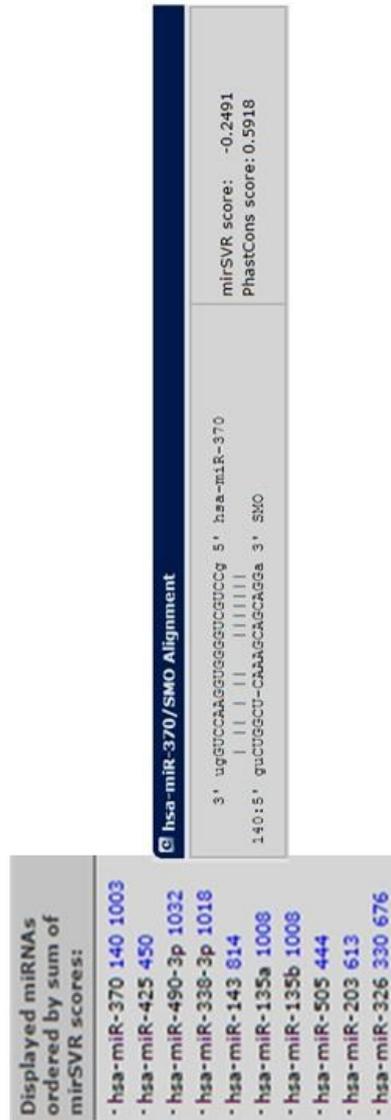
Org	PicTar score	PicTar score per species	microRNA	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
hs	5.11	5.12	hsa-miR-199a	0.99	62	61	-17.8

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea SMO con los programas A) TargetScan 6.0. y B) miRanda-miRSVR y C) PicTar.

A Human SMO 3' UTR



B



Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea MYC con el programa PicTar.

Org	PicTar score	PicTar score per species	microRNA	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
hs	4.46	4.45	hsa-miR-34c	0.99	206	138	-23.0

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea ABCB5 con el programa miRanda-miRSVR.

Displayed miRNAs ordered by sum of miRSVR scores:

- hsa-miR-539 475 493
- hsa-miR-340 211 1085
- hsa-miR-497 1325
- hsa-miR-15b 1324
- hsa-miR-15a 1318
- hsa-miR-103 1322
- hsa-miR-107 1322
- hsa-miR-16 1322
- hsa-miR-195 1326
- hsa-miR-424 1326

G hsa-miR-15b/ABCB5 Alignment

<pre> 3' acuuugGUACUACACGCGAu 5' hsa-miR-15b 1324:5' ceuuuuUAUUAUGUGUCUu 3' ABCB5 </pre>	<p>miRSVR score: -1.2476 PhastCons score: 0.5513</p>
--	--

Predicción bioinformática para posibles miRs cuya diana sea CDKN1A con los programas A) miRanda-miRSVR y B) PicTar.

A

Displayed miRNAs ordered by sum of miRSVR scores:

- hsa-miR-224 1511
- hsa-miR-365 209
- hsa-miR-93 453 1130
- hsa-miR-519d 453 1134
- hsa-miR-20a 453 1135
- hsa-miR-106a 453 1130
- hsa-miR-106b 455 1132
- hsa-miR-17 453 1130
- hsa-miR-20b 454 1135
- hsa-miR-28-5p 1328

1459

hsa-miR-93/CDKN1A Alignment

<pre> 3' GAUGGACGUG-CUUGU--CGUGAAAc 5' hsa-miR-93 1130:5' auccucccccaguuucauugcacuuuug 3' CDKN1A </pre>	<p>miRSVR score: -0.6463 PhastCons score: 0.5989</p>
---	--

B

Org	PicTar score	PicTar score per species	microRNA	Probabilities	Nuclei mapped to alignments	Nuclei mapped to sequence	Free Energies kcal/mol
hs	6.82	5.27	hsa-miR-93	0.93 0.93	619 1368	468 1148	-20.5 -16.0

II. Glosario de abreviaturas

5-FU: 5-fluorouracilo

ABC: ATP-binding cassette

ABCB: ATP-binding cassette subfamily B

ABCC: ATP-binding cassette subfamily C

ABCG: ATP-binding cassette subfamily G

ADARs: adenosine deaminases acting on RNA

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGO: argonauta

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

ALDH: aldehyde dehydrogenase

ALM: acral lentiginous melanoma

AM: arithmetic mean

AML: acute myeloid leukemia

AMOs: anti-miRNAs oligonucleotides

APC: adenomatous polyposis coli/allophycocyanin

APH1: anterior pharynx-defective 1

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosine triphosphate

BAA: Bodipy™-aminoacetate

BAAA: Bodipy™-aminoacetaldehyde

BAAA-DA: Bodipy™ - aminoacetaldehyde-diethyl acetate

BCL2/9: B-cell CLL/lymphoma 2/9

BCRP: breast cancer resistance protein

BCSCs: breast cancer stem cells

BRCA: breast cancer

BSA: bovine serum albumin

CAFs: cancer-associated fibroblasts

CBF1: core binding factor1

CCDN1: cyclin D1

CCL: chemokine (C-C motif) ligand

CCNE1: cyclin E1

CCR: cáncer colorrectal

CCS: cancer subtypes

CDK4/8: cyclin-dependent kinase 4/8

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

CIMP: CpG island methylator phenotype

CIN: chromosomal instability

CK: cytokeratin

CLDN1: claudin 1

CP: crossing points

CpG: cytosine-phospho-guanine

CSCs: cancer stem cells

CSF-1: colony-stimulating factor 1

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand

CXCR: chemokine (C-X-C motif) receptor

CV: coefficient of variance

DEAB: diethylamino-benzaldehyde

DHh: Desert Hedgehog

DKK: dickkopf WNT signaling pathway inhibitor

DLL: delta-like ligands

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

dUMP: deoxyuridine monophosphate

DSH: dishevelled

DVL: dishevelled segment polarity protein

ECAD: e-cadherin

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

EMT: epithelial to mesenchymal transition

EpCAM: epithelial cell adhesion molecule

ER: estrogen receptor

ERK: extracellular-signal-regulated kinases

ES-TFs: embryonic stem cell transcription factors

EXP5: exportina 5

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FAP: familial adenomatous polyposis

FBS: fetal bovine serum

FdUMP: fluorodeoxyuridine monophosphate

FGF: fibroblast growth factor

FITC: fluorescein isothiocyanate

FZD: frizzled

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GAPs: GTPase-activating proteins

GDP: guanosine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GGH: gamma-glutamyl hydrolase

GLI-A: GLI activador

GLI-R: GLI represor

GM: geometric mean

GRB2: growth factor receptor-bound protein 2

GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β

GTP: guanosine triphosphate

HDAC1: histone deacetylase 1

HE: hematoxylin and eosin

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

HER2E: HER2-enriched

Hh: Hedgehog

HIF: hypoxia-inducible factor

HIP: huntingtin interacting protein

HKG: housekeeping gene

HME: high-methylation epigenotype

HNSCC: human head and neck squamous cell carcinoma

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC₅₀: inhibitory concentration 50

IHh: Indian Hedgehog

IL: interleukin

IMC: índice de masa corporal

IME: intermediate-methylation epigenotype

INPP4B: inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II

ITS: insulin transferrin selenium

IVIS: *in vivo* imagen system

KIF3A: kinesin family member 3A

KIT: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

KRAS: kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LGR5: leucine-rich-repeat containing G-protein-coupled receptor 5

LH-RH: luteinising hormone releasing hormone

LME: low-methylation epigenotype

LMM: lentigo maligna melanoma

LNAs: locked nucleic acids

LRP: low-density lipoprotein receptor-related protein

LV: Leucovorin

MAP: MUTYH-associated polyposis

MAP3K1: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase

MAPK: mitogen activated protein kinase

Max: maximal

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

mCRC: metastatic colorectal cancer

MDR: multidrug resistance

MET: mesenchymal-to-epithelial transition

Min: minimal

miR: microRNA

MMP9: matrix metalloproteinase 9

MMR: mismatch repair

mRNA: messenger RNA

MSI: microsatellite instability

MSI-H: microsatellite instability-high

MSI-L: microsatellite instability-low

MSS: microsatellite stable

mTOR: mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MYB: v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog

MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

NCAD: n-cadherin

NF- κ B: nuclear factor kappa B

NLK: nemo-like kinase

NM: nodular melanoma

N-MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

NOD: non obese diabetic

NPs: Nanoparticles

NRAS: neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

NSEP1: nuclease sensitive element binding protein 1

NSG: NOD scid gamma mice

OCT: Optimal cutting temperature

OCT4: octamer-binding transcription factor 4

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: phosphate buffered saline

PCL: polycaprolactone

PDCD4: programmed cell death 4

PDGF: platelet derived growth factor

PK1: 3-phosphoinositide-dependent kinase 1

PDLLA: poly-DL-lactide

PE: phycoerythrin

PEG: polyethylene glycol

PEN-2: presenilin enhancer-2

PEX14: peroxisomal biogenesis factor 14

PFA: paraformaldehyde

PGA: polyglycolic acid

P-gp: P-glicoproteína

PI: propidium iodide

PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PLA: polylactic acid

PLGA: poly lactic-co-glycolic acid

PR: progesterone receptor

PS: phosphatidylserine

P/S: penicillin/streptomycin

PTCH: patched

PTEN: phosphatase and tensin homolog

PU-PEI: polyurethane-short branch-polyethylenimine

qRT-PCR: quantitative real time polymerase chain reaction

RAN: RAS-related nuclear protein

RB: retinoblastoma

RBPJ: recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region

RGP: radial growth phase

RHEB: RAS homolog enriched in brain

RHO A: RAS homolog family member A

RISC: RNA-inducer silencing complex

RNA: ribonucleic acid

ROS: reactive oxygen species

RPM: revolutions per minute

rRNA: ribosomal RNA

SCID: severe combined immunodeficiency

SD: standard deviation

SEM: standard error media

SFRP: secreted frizzled-related protein

SHh: Sonic Hedgehog

SMO: smoothened

SNORD24: small nucleolar RNA, C/D box 24

SNORD44: small nucleolar RNA, C/D box 44

SOX2: SRY (sex determining region Y)-box 2

SP: Side Population

SRB: sulforhodamine-B

SSM: superficial spreading melanoma

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)

SUFU: suppressor of fused homolog

TAMs: tumor-associated macrophages

TCA: trichloroacetic acid

TGF- β : transforming growth factor- β

THF: tetrahydrofolato

TIE1/2: tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1/2

TNF- α : tumor necrosis factor- α

TopBP1: topoisomerase (DNA) II binding protein 1

TP: total population

TP53: tumor protein p53

TR: trypsin-resistant

TRBP: TAR (HIV-1) RNA binding protein

TS: trypsin-sensitive

TSC: tuberous sclerosis

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

VANGL2: VANGL planar cell polarity protein 2

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

VGP: vertical growth phase

VHL: von Hippel-Lindau tumor suppressor

VIM: vimentina

WIF: WNT inhibitory factor

WNT: wingless-type MMTV integration site family

ZEB1/2: zinc finger E-box binding homeobox $\frac{1}{2}$

ZO-1: zona occludens-1

III. ANEXO DE PUBLICACIONES



Original article

Anti-proliferative activity of 2,6-dichloro-9- or 7-(ethoxycarbonylmethyl)-9H- or 7H-purines against several human solid tumour cell lines



Fátima Morales^{a,1}, Alberto Ramírez^{b,c,1}, Ana Conejo-García^a, Cynthia Morata^b, Juan A. Marchal^b, Joaquín M. Campos^{a,*}

^aDepartamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

^bInstituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Avenida de Madrid s/n, 18071 Granada, Spain

^cDepartamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2013

Received in revised form

19 January 2014

Accepted 8 February 2014

Available online 10 February 2014

Keywords:

Anti-tumour compounds

Apoptosis

5-Fluorouracil

Breast cancer

Colon cancer

Melanoma

Purines

ABSTRACT

As leads we took several benzo-fused seven- and six-membered scaffolds linked to the pyrimidine or purine moieties with notable anti-proliferative activity against human breast, colon and melanoma cancerous cell lines. We then decided to maintain the double-ringed nitrogenous bases and change the other components to the ethyl acetate moiety. This way six purine and two 5-fluorouracil derivatives were obtained and evaluated against the MCF-7, HCT-116, A-375 and G-361 cancer cell lines. Two QSARs are obtained between the anti-proliferative IC₅₀ values for compounds **26–33** and the clog *P* against the melanoma cell lines A-375 and G-361. Our results show that two of the analogues [ethyl 2-(2,6-dichloro-9H- or 7H-purine-9- or 7-yl)acetates (**30** and **33**, respectively)] are potent cytotoxic agents against all the tumour cell lines assayed, showing single-digit micromolar IC₅₀ values. This exemplifies the potential of our previously reported purine compounds to qualify as lead structures for medicinal chemistry campaigns, affording simplified analogues easy to synthesize and with a noteworthy bioactivity. The selective activity of **30** and **33** against the melanoma cell line A-375, via apoptosis, supposes a great advantage for a future therapeutic use.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the first cause of death by neoplasia among women of industrialized countries and represents nearly 25% of non-accidental deaths of women between 35 and 54 years of age [1]. The frequency of breast cancer increases with age up to the menopause and subsequently continues to rise but more slowly [2]. Conventional cancer chemotherapy blocks cell division but lacks selectivity for oncogenic cells which can result in serious cytotoxic side effects for the patient. The key to specificity in cancer chemotherapy may be found in the pharmacological targeting of specific molecules avoiding cytotoxicity against normal cells [3].

Metastatic melanoma is a disease with limited treatment options and a poor prognosis. Malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer with increasing incidence over the past years [4]. Metastatic melanoma has a short median survival and is responsible for most skin cancer deaths [5]. Often melanomas are characterized by resistance to cytotoxic agents because of the inactivation of apoptotic pathways [6].

Colorectal cancer is a common disease that results in significant worldwide morbidity and mortality. It is the second leading cause of global cancer mortality, and accounts for over 600,000 deaths annually [7].

Having previously reported the synthesis and anticancer activities of cyclic 5-fluorouracil (5-FU) *O,N*-acetalic compounds (**1**), we changed 5-FU for uracil (**2**), with the aim of finding an anti-proliferative agent endowed with a new mechanism of action [8]. Following our ongoing Anticancer Drug Programme we planned the synthesis of compounds bearing a pyrimidine base, and also the oxygen atom at position 1 of the seven-membered cycle was replaced by its isosteric sulfur atom (**3**, **4**) and its oxidized states.

Abbreviations: DCA, Dichloroacetate; FACS, Flow cytometry; 5-FU, 5-Fluorouracil; MW, Microwave; SRB, Sulforhodamine-B.

* Corresponding author.

E-mail address: jmcampos@ugr.es (J.M. Campos).

¹ These authors contributed equally to this work.

Later on, the pyrimidine base was substituted for the purine one with the objective of increasing both the lipophilicity and the structural diversity of the target molecules (**5–19**). Structures were designed in which both structural entities (such as the benzo-heterocyclic ring and the purine base) were linked through a methylene linker (**20–25**). A series of (*RS*)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9*H*-purine derivatives (**20–22**) were obtained and the anticancer activity for the most active compounds was correlated with their capability to induce apoptosis. In order to complete an SAR study, a series of (*RS*)-6-substituted-7- or 9-(1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-7*H*- or 9*H*-purines (**23–25**) was prepared [9] (Chart 1).

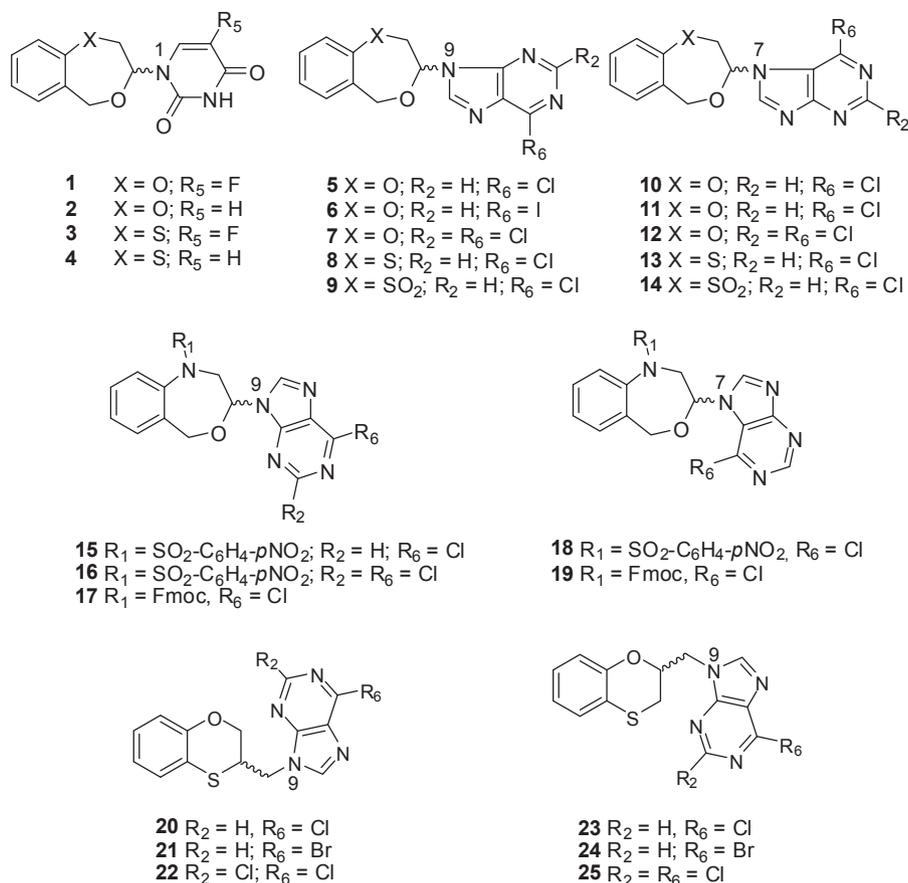


Chart 1. Benzo-fused seven-membered linked to pyrimidines (**1–4**), to purines (**5–19**), and benzo-fused six-membered rings linked to purines (**20–25**).

Compound **16** presents an IC₅₀ of 0.166 μM against the human cancerous cell line MDA-MB-231. Compound **16** was the most selective against the human breast adenocarcinoma MCF-7

We took the benzo-fused seven- and six-membered scaffolds linked to the pyrimidine or purine moieties **1–25** (Chart 1) as leader compounds, and decided to maintain the double-ringed

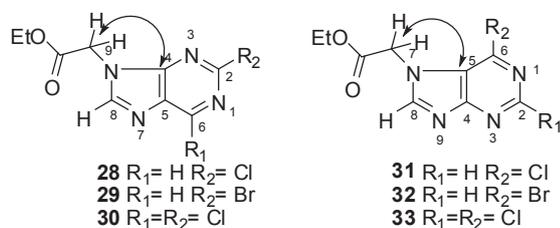


Fig. 1. The HMBC interactions that discriminate *N*-9 (**28–30**) and *N*-7 (**31–33**) purine regioisomers.

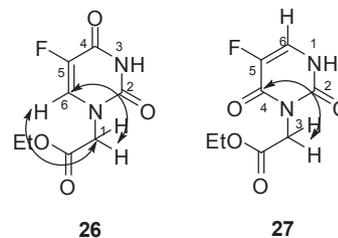


Fig. 2. The HMBC interactions that discriminate *N*-1 (**26**) and *N*-3 (**27**) 5-FU derivatives.

nitrogenous bases and, as a first approach, connect the other components to the ethyl acetate (drastic molecular pruning) rest, which is related to DCA. Such a very simple reasoning has guided us in spite of a remote resemblance to the model structures. Should compounds **26–33** (Chart 2) show notorious anti-proliferative activity, the simplicity of their preparation and the use of ordinary chemistry militate in their favour, although is not always accepted with enthusiasm by organic chemists. In this communication we report the synthesis and anti-proliferative activity against the human breast cancer cell line MCF-7, the human colon carcinoma cell line HCT-116, and two human melanoma cell lines such as A-375 and G-361 of two 5-FU derivatives (**26**, **27**), and six purine scaffolds (**28–33**) (Chart 2).

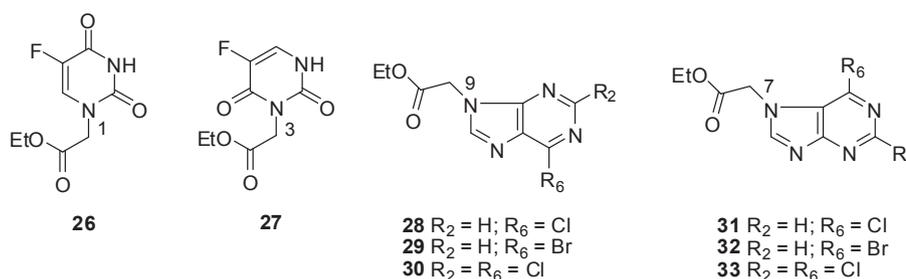


Chart 2. Target molecules under study in this paper: *N*-1 (**26**) and *N*-3 (**27**) 5-FU derivatives, *N*-9 (**28–30**) and *N*-7 (**31–33**) purine compounds.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

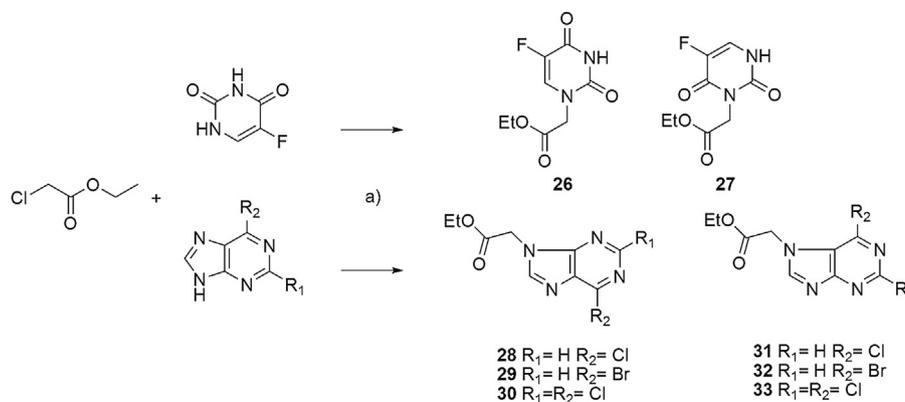
Compounds **26–33** were obtained as shown in Scheme 1. Nucleophilic substitution assisted by microwave (MW) irradiation of ethyl chloroacetate using water as solvent and Et_3N as a base afforded compounds **26–33**. This rapid, convenient and green protocol was previously described for the synthesis of **28** and **30** [13]. Whereas the authors reported the isolation of the *N*-9 regioisomers (**28** and **30**), we obtained the *N*-9 and the *N*-7 isomers in each reaction (**28** and **31**, **30** and **33**, respectively) using the same conditions. We also conducted the synthesis of the bromopurine and 5-FU derivatives obtaining the *N*-9 and *N*-7 bromopurine isomers (**29** and **32**) and the *N*-1 and *N*-3 5-FU regioisomers (**26** and **27**). Compound **26** was previously reported [14], although in a non-easily accessible journal. The synthesis of its *N*-3 5-FU isomer (**27**) is described in another

hydrogen atoms are correlated with $C_{4_{pur}}$ in the *N*-9 regioisomers, they are correlated with $C_{5_{pur}}$ in the *N*-7 regioisomers (Fig. 1).

In the 5-FU derivatives, the identification of the *N*-1 isomer (**26**) relies on the observation of the 1,3-connection between the hydrogen atoms of the carbon linked to the 5-FU and the sole tertiary carbon of the 5-FU moiety ($C_{6_{5FU}}$) and the opposite connection: $H_{6_{5FU}}$ and the carbon linked to the 5-FU (Fig. 2) in the HMBC spectrum (Figs. S1–S4). These correlations do not exist in its isomer *N*-3 (**27**). The correlation in **27** appears between the hydrogen atoms of the carbon linked to the 5-FU and $C_{4_{5FU}}$.

2.3. Biological activities

Table 1 shows the anti-proliferative activities against the MCF-7, HCT-116, A-375 and G-361 cancerous cell lines for the target compounds. As a rule of thumb, the following can be stated: (a) The 2,6-dichloropurine derivatives (**30**, **33**) are the most active compounds showing single-digit micromolar IC_{50} values against all the



Scheme 1. Reagents and conditions: a) Et_3N , H_2O , $105\text{ }^\circ\text{C}$, MW, 8 min (13% for **26**, 6% for **27**, 24% for **28**, 28% for **29**, 40% for **30**, 12% for **31**, 9% for **32**, 15% for **33**).

Table 1
Anti-proliferative activities^a for compounds **26–33** against the cancerous cell lines MCF-7, HCT-116, A-375 and G-361.

Comp	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	clogP ^b
	MCF-7	HCT-116	A-375	G-361	
26	25.2 ± 0.03	24.6 ± 0.01	38.4 ± 0.06	29.0 ± 0.01	-0.07 ± 0.20
27	30.5 ± 0.03	22.6 ± 0.01	50.9 ± 0.13	25.4 ± 0.01	-0.27 ± 0.19
28	35.1 ± 0.03	5.27 ± 0.04	18.9 ± 0.09	21.4 ± 0.01	0.49 ± 0.15
31	49.8 ± 0.03	68.0 ± 0.04	14.5 ± 0.12	21.4 ± 0.01	0.49 ± 0.15
29	14.1 ± 0.06	23.5 ± 0.04	13.4 ± 0.03	15.8 ± 0.01	0.56 ± 0.14
32	20.2 ± 0.06	55.7 ± 0.04	26.7 ± 0.01	18.3 ± 0.01	0.51 ± 0.14
30	3.93 ± 0.04	6.20 ± 0.05	1.18 ± 0.03	3.06 ± 0.01	1.34 ± 0.15
33	5.63 ± 0.03	6.36 ± 0.06	4.98 ± 0.07	5.67 ± 0.01	1.32 ± 0.15

^a All experiments were conducted in duplicate and gave similar results. The data are means ± SEM of three independent determinations.

^b Pallas 3.8.1.1 CompuDrug Chemistry Ltd. Copyright (c) 1994, 2006.

assayed cell lines, the *N*-9 derivative (**30**) eliciting improved activities in all cancerous cell lines than its *N*-7 regioisomer (**33**); (b) In general, the *N*-9 purine derivatives present an augmented activity than that of their *N*-7 regioisomers except in the case of the 6-chloropurines (**28** and **29**), in which this tendency is reversed against A-375, and G-361: both regioisomers are equally potent in inhibiting both melanoma cancer cell growth; (c) The 5-FU derivatives evidence intermediate potencies (IC₅₀ ≈ 22 and 50 μM), being the *N*-1 isomer (**26**) more active than *N*-3 (**27**) against MCF-7 and A-375, except in the case of HCT-116 and G-361 cell lines.

A quick look at the IC₅₀ values suggests that a correlation with the lipophilicity of the target compounds may exist, and we therefore decided to find the corresponding QSAR equations. Used in its logarithmic form (log *P*) the octanol–water partition coefficient is the most widely accepted measure of lipophilicity. Fragmental methods make it possible to create data banks and to perform log *P* calculations by computer.

Correlations 1 and 2 show the anti-proliferative activities of the targeted compounds against the melanoma cell line A-375 and the clog *P* values of **26–33**. Such clog *P* values reported in Table 1 were calculated using the PALLAS programme [16].

$$p(\text{IC}_{50})_{\text{A-375}} = 4.40(\pm 0.12) + 0.85(\pm 0.15)c \log P$$

$$n = 8, \quad r = 0.920, \quad s = 0.224, \quad F_{1,5} = 32.96, \quad p < 0.005 \quad (1)$$

where $p(\text{IC}_{50})_{\text{A-375}} = -\log(\text{IC}_{50})_{\text{A-375}}$, bearing in mind that the higher the value of $p(\text{IC}_{50})_{\text{A-375}}$ the more potent is the compound, *n* is the number of compounds, *r* is the correlation coefficient, *s* is the standard deviation, data within parentheses are standard errors of estimate, and *F*_{1,5} is the Fisher test (*p* < 0.005).

Table 2

Cell cycle distribution and apoptosis induction in the human breast MCF-7 cancer cell line after treatment for 24 h for the two most active compounds **30** and **33** as anti-proliferative agents.

Compound	Cell cycle ^{a,b}			Apoptosis ^{a,b,c}
	G ₀ /g ₁	S	G ₂ /M	
Control	34.58 ± 0.09	14.50 ± 1.06	50.91 ± 1.15	10.80 ± 0.85
30	28.17 ± 1.37	15.39 ± 0.68	54.63 ± 1.18	20.53 ± 0.91
33	34.54 ± 0.08	18.27 ± 0.79	47.19 ± 0.89	24.10 ± 4.37

^a Determined by flow cytometry [17].

^b All experiments were conducted in triplicate and gave similar results. The data are means ± SEM of three independent determinations.

^c Apoptosis was determined using an Annexin V-based assay [17]. The data indicate the percentage of cells undergoing apoptosis in each sample.

Eq. 2 shows the anti-proliferative activity of the targeted compounds against the G-361 cell line:

$$p(\text{IC}_{50})_{\text{G-361}} = 4.55(\pm 0.08) + 0.55(\pm 0.10)c \log P$$

$$n = 8, \quad r = 0.920, \quad s = 0.159, \quad F_{1,5} = 27.12, \quad p < 0.005 \quad (2)$$

No correlation is obtained for the anti-proliferative activity of **26–33** and their clog *P* values (*r* = 0.631 against MCF-7, and *r* = 0.353 against HCT-116).

The use of cell-cycle-specific treatments in cancer therapy has greatly benefited from the major advances that have been recently made in the identification of the molecular actors regulating the cell cycle and from the better understanding of the connections between cell cycle and apoptosis [17]. To study the mechanisms of the anti-tumour activity of the most active compounds (**30** and **33**), the effects on the cell cycle distribution and apoptosis were analysed by flow cytometry (FACS) (Tables 2–4). For this purpose we used the MCF-7, HCT-116 and A-375 cell lines as representatives for breast, colon and melanoma tumours, respectively. The A-375 melanoma cell line was selected because of its higher metastatic phenotype in comparison with G-361 [18]. MCF-7 cells treated for 24 h with **30** and **33** did not show significant differences in the cell cycle progression compared with DMSO-treated control cells. We found a slight cell cycle arrest in the G₂/M and S-phases induced by **30** (54.63 ± 1.18) and **33** (18.27 ± 0.79), respectively (Table 2). In the HCT-116 and A-375 treated cells, **30** did not modify the cell cycle profile and **33** provoked a G₂/M cell cycle arrest (28.47 ± 0.07) at the expense of the G₀/G₁-phase (33.58 ± 1.90) in the colon cancer cells and accumulated the A-375 melanoma cells in the G₀/G₁-phase (70.55 ± 1.47) at the expense of both G₂/M and S phases (20.10 ± 0.75 and 9.34 ± 0.62, respectively) (Tables 3 and 4). Previously, we have demonstrated that potent anti-tumour drugs did not modify the cell cycle in comparison with control cells, due to a translational block and consequently inhibition of the protein synthesis by the activation and phosphorylation of the initiation factor eIF2α [10].

Apoptotic defects in cancer cells are the primary obstacle that limits the therapeutic efficacy of anticancer agents, and hence the development of novel agents targeting programmed cell death pathways has become an imperative mission for clinical research [19,20]. Although both compounds showed different cell cycle profiles that were dependent upon the cell line studied, however, **30** and **33** at 24 h induced high levels of apoptosis in all cancer cells in comparison with DMSO-treated cell cultures (Tables 2–4). This apoptosis was induced even in the MCF-7 breast cancer cells that have shown deficiency in the caspase-activation mechanisms [21]. Interestingly, **30** was the most apoptotic compound against the A-375 melanoma cell line (35.37 ± 0.47), where no modification in the cell cycle were found. This effect could be explained by a

Table 3

Cell cycle distribution and apoptosis induction in the HCT-116 colon cancer cell line after treatment for 24 h for the two most active compounds **30** and **33** as anti-proliferative agents.

Compound	Cell cycle ^{a,b}			Apoptosis ^{a,b,c}
	G ₀ /g ₁	S	G ₂ /M	
Control	44.70 ± 0.38	38.26 ± 1.40	17.02 ± 1.40	7.27 ± 1.57
30	45.93 ± 1.11	36.75 ± 0.70	17.31 ± 0.44	20.20 ± 3.18
33	33.58 ± 1.90	37.93 ± 1.92	28.47 ± 0.07	17.03 ± 1.00

^a Determined by flow cytometry [17].

^b All experiments were conducted in triplicate and gave similar results. The data are means ± SEM of three independent determinations.

^c Apoptosis was determined using an Annexin V-based assay [17]. The data indicate the percentage of cells undergoing apoptosis in each sample.

Table 4

Cell cycle distribution and apoptosis induction in the A-375 colon cancer cell line after treatment for 24 h for the two most active compounds **30** and **33** as anti-proliferative agents.

Compound	Cell cycle ^{a,b}			Apoptosis ^{a,b,c}
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Control	57.97 ± 0.93	29.60 ± 0.78	12.42 ± 0.70	6.83 ± 0.40
30	58.48 ± 1.03	28.78 ± 0.26	12.73 ± 0.77	35.37 ± 0.47
33	70.55 ± 1.47	20.10 ± 0.75	9.34 ± 0.62	27.13 ± 3.07

^a Determined by flow cytometry [17].

^b All experiments were conducted in triplicate and gave similar results. The data are means ± SEM of three independent determinations.

^c Apoptosis was determined using an Annexin V-based assay [17]. The data indicate the percentage of cells undergoing apoptosis in each sample.

preferentially apoptotic mechanism of action. Moreover, the fact that **33** gathered cells at G₂/M and G₀/G₁ phases respectively in the colon and melanoma cancer cells accompanied by high levels of programmed death cell indicates that this compound has different cytotoxic effects on each tumour cell type.

3. Conclusion

The anti-proliferative potential of the target molecules is reported against four human cancerous cell lines. Two QSARs are obtained between the anti-proliferative IC₅₀ values for compounds **26–33** and the clog *P* against the melanoma cell lines A-375 and G-361. Using our purine derivatives as lead structures, we have obtained a simplified analogue with a remarkable bioactivity. The most active compounds are always **30** and **33** and the results indicate that the anti-proliferative activity of **33** is correlated with its ability to induce apoptosis against the human melanoma cell line A375. The mechanism through which molecules **30** and **33** elicit their effects is currently being elucidated.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

Melting points were taken in open capillaries on an Electro-thermal melting point apparatus and are uncorrected. Analytical thin layer chromatography was performed using Merck Kieselgel 60 F254 aluminum sheets, the spots being developed with UV light ($\lambda = 254$ nm). All evaporation was carried out in vacuo with a Büchi rotary evaporator and the pressure controlled by a Vacuubrand CVCII apparatus. For flash chromatography, Merck silica gel 60 with a particle size of 0.040–0.063 mm (230–400 mesh ASTM) was used. Elemental analyses were within ±0.4% of the theoretical values. Nuclear magnetic resonance spectra have been carried out at the Centro de Instrumentación Científica/Universidad de Granada, and recorded on a 300 MHz ¹H and 75 MHz ¹³C NMR Varian Inova-TM spectrometers at ambient temperature. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak. Signals are designated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; pst, pseudo-triplet; q, quartet. The HMBC spectra were measured using a pulse sequence optimized for 10 Hz (inter-pulse delay for the evolution of long-range couplings: 50 ms) and a 5/3/4 gradient combination. In this way, direct responses (J couplings) were not completely removed. High-resolution Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization or Electrospray Ionization mass spectra were carried out on a Bruker Autoflex or a Waters LCT Premier Mass Spectrometer, respectively. Small scale microwave-assisted synthesis was carried out in an Initiator 2.0 single-mode microwave instrument producing controlled irradiation at

2.450 GHz (Biotage AB, Uppsala). Reaction time refers to hold time at 105 °C, not to total irradiation time. The temperature was measured with an IR sensor outside the reaction vessel. Anhydrous THF was purchased from VWR International Eurolab. Anhydrous conditions were performed under argon. 5-FU, 6-chloropurine, 6-bromopurine and 2,6-dichloropurine were purchased from Aldrich.

4.1.1. General procedure for the microwave-assisted syntheses of **26–33**

Ethyl chloroacetate (6 mmol) was added dropwise to a mixture of Et₃N (4 mmol) and the corresponding purine derivative or 5-FU (2 mmol) in water (5 mL). The microwave vial was sealed and irradiated at 105 °C for 8 min. After completion of irradiation time and cooling to room temperature through rapid pressurized air supply gas-jet, the resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) and the organic phase was dried (MgSO₄). The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂/CH₃OH (10/0.1) as eluent.

4.1.1.1. 5-Fluoro-1-(ethoxycarbonylmethyl)-3H-pyrimidine-2,4-dione (26). White solid (57 mg, 13%); mp: 165–166 °C (lit¹⁴ 164–165 °C). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.83$ (s, 1H, H1), 7.21 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H6), 4.43 (s, 2H, CH₂CO), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 167.09$ (CO), 156.87 (C4), 149.31 (C2), 141.60 (C5), 128.86 (C6), 62.67 (CH₂O), 49.02 (CH₂CO), 14.24 (CH₃). HRMS *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₈H₁₀FN₂O₄: 217.0546, found: 217.0546. Anal. Calc. for C₈H₉FN₂O₄: C, 44.45; H, 4.20; N, 12.96. Found: C, 44.21; H, 4.39; N, 13.01.

4.1.1.2. 5-Fluoro-3-(ethoxycarbonylmethyl)-1H-pyrimidine-2,4-dione (27). Light orange solid (26 mg, 6%); mp: 131–132 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.26$ (s, 1H, H1), 7.29 (pst, 1H, H6), 4.68 (s, 2H, CH₂CO), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 167.09$ (CO), 156.77 (C4), 149.59 (C2), 139.70 (C5), 128.59 (C6), 62.67 (CH₂O), 49.07 (CH₂CO), 14.24 (CH₃). HRMS *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₈H₁₀FN₂O₄: 217.0546, found: 217.0546. Anal. Calc. for C₈H₉FN₂O₄: C, 44.45; H, 4.20; N, 12.96. Found: C, 44.21; H, 4.59; N, 12.63.

4.1.1.3. 6-Chloro-9-(ethoxycarbonylmethyl)-9H-purine (28). White solid (117 mg, 24%); mp: 97–98 °C (lit 96–98 °C) [22]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.74$ (s, 1H, H2), 8.20 (s, 1H, H8), 5.05 (s, 2H, CH₂CO), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 166.56$ (CO), 152.37 (C2), 152.03 (C4), 151.39 (C6), 145.58 (C8), 131.33 (C5), 62.82 (CH₂O), 44.69 (CH₂CO), 14.20 (CH₃). HRMS *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₀ClN₄O₂: 241.0414, found: 241.0488. Anal. Calc. for C₉H₉ClN₄O₂: C, 44.92; H, 3.77; N, 23.28. Found: C, 44.99; H, 3.59; S, 23.39.

4.1.1.4. 6-Chloro-7-(ethoxycarbonylmethyl)-7H-purine (31). White solid (59 mg, 12%); mp: 122–123 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.87$ (s, 1H, H2), 8.28 (s, 1H, H8), 5.23 (s, 2H, CH₂CO), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 166.76$ (CO), 162.00 (C4), 152.81 (C2), 149.72 (C6), 143.16 (C8), 122.80 (C5), 62.90 (CH₂O), 48.19 (CH₂CO), 14.17 (CH₃). HRMS *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₀ClN₄O₂: 241.0414, found: 241.0487. Anal. Calc. For C₉H₉ClN₄O₂: C, 44.92; H, 3.77; N, 23.28. Found: C, 45.21; H, 3.59; N, 23.42.

4.1.1.5. 6-Bromo-9-(ethoxycarbonylmethyl)-9H-purine (29). White solid (157 mg, 28%); mp: 104–105 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.71$ (s, 1H, H2), 8.23 (s, 1H, H8), 5.05 (s, 2H, CH₂CO), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 166.52$ (CO), 152.36 (C2), 150.80 (C4), 145.53 (C8), 143.46 (C6), 133.89 (C5), 62.85 (CH₂O), 44.75 (CH₂CO), 14.21

(CH₃). HRMS m/z [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₀BrN₄O₂: 284.9909, found: 284.9910. Anal. Calc. for C₉H₉BrN₄O₂: C, 37.92; H, 3.18; N, 19.65. Found: C, 37.72; H, 3.49; N, 19.38.

4.1.1.6. 6-Bromo-7-(ethoxycarbonylmethyl)-7H-purine (32). Yellow syrup (50 mg, 9%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.90 (s, 1H, H2), 8.65 (s, 1H, H8), 5.32 (s, 2H, CH₂CO), 4.29 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.67 (CO), 159.41 (C4), 152.99 (C2), 149.77 (C8), 133.93 (C6), 122.69 (C5), 63.06 (CH₂O), 48.29 (CH₂CO), 14.21 (CH₃). HRMS m/z [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₀BrN₄O₂: 284.9909, found: 284.9991. Anal. Calc. For C₉H₉BrN₄O₂: C, 37.92; H, 3.18; N, 19.65. Found: C, 37.64; H, 3.42; N, 19.33.

4.1.1.7. 2,6-Dichloro-9-(ethoxycarbonylmethyl)-9H-purine (30). White solid (218 mg, 40%); mp: 120–121 °C (lit¹³ 112–113 °C). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.18 (s, 1H, H8), 5.02 (s, 2H, CH₂CO), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.25 (CO), 153.30 (C6), 153.26 (C4), 151.95 (C2), 146.33 (C8), 130.39 (C5), 62.90 (CH₂O), 44.70 (CH₂CO), 14.10 (CH₃). HRMS m/z [M + H]⁺ calcd for C₉H₉Cl₂N₄O₂: 275.0024, found: 275.0096. Anal. Calc. for C₉H₈Cl₂N₄O₂: C, 39.29; H, 2.93; N, 20.37. Found: C, 39.01; H, 2.63; N, 20.09.

4.1.1.8. 2,6-Dichloro-7-(ethoxycarbonylmethyl)-7H-purine (33). Yellow syrup (82 mg, 15%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.29 (s, 1H, H8), 5.22 (s, 2H, CH₂CO), 4.29 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 166.49 (CO), 163.61 (C4), 153.53 (C6), 152.00 (C8), 143.90 (C2), 122.05 (C5), 63.11 (CH₂O), 48.25 (CH₂CO), 14.21 (CH₃). HRMS m/z [M + H]⁺ calcd for C₉H₉Cl₂N₄O₂: 275.0024, found: 274.0096. Anal. Calc. for C₉H₈Cl₂N₄O₂: C, 39.29; H, 2.93; N, 20.37. Found: C, 38.91; H, 2.64; N, 20.20.

4.2. Biology

4.2.1. Cell culture

MCF-7, HCT-116, A-375 and G-361 cells were grown at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, with Dubelcco's modified Eagle Medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), 2% L-glutamine, 2.7% sodium bicarbonate, 1% Hepes buffer, 40 mg/L gentamicin and 500 mg/L ampicillin.

4.2.2. Drug treatment

Compounds were dissolved in DMSO and stored at –20 °C. For each experiment, the stock solutions were further diluted in medium to obtain the desired concentrations. The final solvent concentration in cell culture was ≤0.1% v/v of DMSO, a concentration without any effect on cell replication. Parallel cultures of MCF-7, HCT-116, A-375 and G-361 cells in medium with DMSO were used as controls.

4.2.3. Proliferation assays

The effect of the compounds on cell viability was assessed using the sulforhodamine-B (SRB) colorimetric assay. Cells suspension (30 × 10³ cells/well) were seeded onto 24-well plates and incubated for 24 h. The cells were then treated with different concentrations of drugs in their respective culture medium and maintained with the treatment for 3 additional days. Thereafter, we used a Titertek Multiskan (Flow, Irvine, California) at 492 nm. We evaluated linearity of the SRB assay with a cell number for each cell stock before each cell growth experiment. The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) values were calculated from semi-logarithmic

dose–response curves by linear interpolation. All of the experiments were plated in triplicate wells and were carried out twice.

4.2.4. Cell cycle distribution analysis

The cells at 70% confluence were treated with either DMSO alone or with concentrations of compounds **30** and **33** determined by their IC₅₀ values. FACS analysis was performed after 24 h of treatment as described [17]. All experiments were performed in triplicate and yielded similar results.

4.2.5. Apoptosis detection by staining with annexin V-FITC and propidium iodide

The annexin V-FITC apoptosis detection kit I (Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used to detect apoptosis by flow cytometry according to Marchal et al. [17]. Apoptosis induction in the MCF-7, HCT-116 and A-375 human cancer cell lines after treatment for 24 h was determined for compounds **30** and **33** at doses of their corresponding IC₅₀. All experiments were performed in triplicate and yielded similar results.

4.2.6. Statistical analyses

All the quantitative data in the present study are reported as means ± standard derivation from at least three independent experiments. Two-way ANOVA was used for grouped analysis of differences followed by Bonferroni post-tests.

Acknowledgements

We thank the Instituto de Salud Carlos III [Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) through projects no. PI10/00592 and PI10/02295] and the ERDF (European Regional Development Fund) for financial supports.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.012>.

References

- [1] G. Ursin, L. Bernstein, M.C. Pike, Breast cancer, in: Trends in Cancer Incidence and Mortality, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plain-view, New York, 1994.
- [2] V.F. Guinee, T. Moller, Breast carcinoma in young patients, *Lancet* 356 (2000) 1113.
- [3] P. Workman, S.B. Kaye, Translating basic cancer research into new cancer therapeutics, *Trends in Molecular Medicine* 8 (2002) S1–S9.
- [4] D.L. Cummins, J.M. Cummins, H. Pantle, M.A. Silverman, A.L. Leonard, A. Channugam, Cutaneous malignant melanoma, *Mayo Clinic Proceedings* 81 (2006) 500–507.
- [5] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, M.J. Thun, Cancer statistics, 2006, *CA: Cancer Journal for Clinicians* 56 (2006) 106–130.
- [6] V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, R. Marais, Melanoma biology and new targeted therapy, *Nature* 445 (2007) 851–857.
- [7] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2011) 69–90.
- [8] M.C. Núñez, M. Díaz-Gavilán, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M.A. Gallo, A. Espinosa, J.M. Campos, Design, synthesis and anticancer activity against the MCF-7 cell line of benzo-fused 1,4-dihetero seven- and six-membered tethered pyrimidines and purines, *Current Medicinal Chemistry* 15 (2008) 2614–2631.
- [9] A. Conejo-García, M.E. García-Rubiño, J.A. Marchal, M.C. Núñez, A. Ramírez, S. Cimino, M.A. García, A. Aránega, M.A. Gallo, J.M. Campos, Synthesis and anticancer activity of (R_S)-9-(2,3-Dihydro-1,4-Benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9H-Purines, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 3795–3801.
- [10] L.C. López-Cara, A. Conejo-García, J.A. Marchal, G. Macchione, O. Cruz-López, H. Boulaiz, M.A. García, F. Rodríguez-Serrano, A. Ramírez, C. Catiavela, A.I. Jiménez, J.M. García-Ruiz, D. Choquesillo-Lazarte, A. Aránega, J.M. Campos, New (R_S)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: the chiral switch from (R_S)-2,6-Dichloro-9-[1-(*p*-Nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-Tetrahydro-4,1-Benzoxazepin-3-yl]-9H-Purine, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 249–258.

- [11] Y. Duan, X. Zhao, W. Ren, X. Wang, K.F. Yu, D. Li, X. Zhang, Q. Zhang, Antitumour activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation, *Onco Targets and Therapy* 6 (2013) 189–198.
- [12] W.Y. Sánchez, S.L. McGee, T. Connor, B. Mottram, A. Wilkinson, J.P. Whitehead, S. Vuckovic, L. Catley, Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib, *British Journal of Cancer* 108 (2013) 1624–1633.
- [13] G. Qu, Z. Zhang, H. Guo, M. Geng, R. Xia, Microwave-assisted rapid and regioselective synthesis of *N*-(alkoxycarbonylmethyl) nucleobases in water, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18 (2007) 1061–1067.
- [14] S. Xu, W. Zhang, Green synthesis of *N*1-[(ethoxycarbonyl)methyl]-5-fluorouracil under microwave irradiation conditions, *Yingyong Huagong* 37 (2008) 290–292.
- [15] L. Xu, L. Weng, H. Zheng, Synthesis of 5-fluorouracil derivatives containing alkanolic acid, *Sichuan Daxue Xuebao (Yixueban)* 37 (2006) 644–646.
- [16] PALLAS 3.8.1.1, A Prediction Tool of Physicochemical Parameters, is supplied by CompuDrug Chemistry, Ltd, PO Box, Rochester, NY 14692, USA.
- [17] J.A. Marchal, H. Boulaiz, I. Suárez, E. Saniger, J. Campos, E. Carrillo, J. Prados, M.A. Gallo, A. Espinosa, A. Aránega, Growth inhibition, G1-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives, *Investigational New Drugs* 22 (2004) 379–389.
- [18] N. Ikoma, H. Yamazaki, Y. Abe, Y. Oida, Y. Ohnishi, H. Suemizu, H. Matsumoto, T. Matsuyama, Y. Ohta, A. Ozawa, Y. Ueyama, M. Nakamura, S100A4 expression with reduced E-cadherin expression predicts distant metastasis of human malignant melanoma cell lines in the NOD/SCID/gammaC null (NOG) mouse model, *Oncology Reports* 14 (2005) 633–637.
- [19] B.S. Cummings, G.R. Kinsey, L.J. Bolchoz, R.G. Schnellmann, Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310 (2004) 126–134.
- [20] O. Caba, F. Rodríguez-Serrano, M. Díaz-Gavilán, A. Conejo-García, R. Ortiz, A. Martínez-Amat, P. Alvarez, M.A. Gallo, J.M. Campos, J.A. Marchal, A. Aránega, The selective cytotoxic activity in breast cancer cells by an anthranilic alcohol-derived acyclic 5-fluorouracil *O,N*-acetal is mediated by endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *European Journal of Medicinal Chemistry* 50 (2012) 376–382.
- [21] S. Kagawa, J. Gu, T. Honda, T.J. McDonnell, S.G. Swisher, J.A. Roth, B. Fang, Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death, *Clinical Cancer Research* 7 (2001) 1474–1480.
- [22] Q. Zhang, G. Cheng, Y.-Z. Huang, G.-R. Qu, H.-Y. Niu, H.-M. Guo, Regioselective *N*9 alkylation of purine rings assisted by β -cyclodextrin, *Tetrahedron* 68 (2012) 7822–7826.



Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells

Journal:	<i>Stem Cells</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Morata Tarifa, Cynthia; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Jiménez, Gema; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada. Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada. Department of Human Anatomy and Embryology, University of Granada., García, María A.; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada. Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada. Department of Oncology, University Hospital Virgen de las Nieves., Entrena, José M.; Institute of Neuroscience, Biomedical Research Center, University of Granada. Animal Behavior Research Unit, Scientific Instrumentation Center, University of Granada.,</p> <p>Picón Ruiz, Manuel; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada. Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada. Granada, Spain. Braman Family Breast Cancer Institute, Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami, Miller School of Medicine.,</p> <p>Marchal, Juan Antonio; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada. Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada. Department of Human Anatomy and Embryology, University of Granada., Griñán Lisón, Carmen; Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada,</p>
Keywords:	Xenogeneic stem cell transplantation, cancer stem cells, In vivo tracking, Cell surface markers, miRNA, Neoplastic stem cell biology, Self-renewal, Serum-free

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Prof. Jan A. Nolte
2 Editor-in-Chief
3 Stem Cells

4 RE: Cover Letter - Submission by Morata-Tarifa C. *et al*

5
6
7
8 Granada, Spain. March 19th 2015

9 Dear Dr. Nolte

10
11
12 Please find below a cover letter supporting the relevance of our findings which we would like to be considered
13 for publication in **Stem Cells** as Research Article. The work is entitled “**Low adherent cancer cell**
14 **subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-**
15 **induced cancer stem-like cells** ” by Morata-Tarifa C. *et al*.
16
17

18
19
20 The identification and isolation of cancer stem cells (CSCs) is one of the topic researches in cancer since
21 these subpopulations are responsible for tumor progression, metastasis, therapy resistance and cancer
22 recurrence. Understanding the mechanism involved in the growth conditions and find the best methodology to
23 isolate prospectively cancer stem-like cells are required for subsequent biological and preclinical studies.
24 Moreover, this knowledge is necessary for analyze the clinical implication of these subpopulations in the
25 disease and future applications. In this work we demonstrate that breast and colon cancer cell cultures contain
26 low adherent trypsin-sensitive (TS) cells subpopulations with increased ALDH activity, higher ability to exclude
27 Hoechst 33342, and with a cancer stem-like cell phenotype. These subpopulation are enriched in sphere- and
28 colony-forming cells and express high levels of SLUG, SNAIL, VIMENTIN and N-CADHERIN while show a
29 lack of E-CADHERIN and CLAUDIN expression, being this profile characteristic of epithelial-to-mesenchymal
30 transition (EMT). In the TS subpopulation, CXCL10, BMI-1 and OCT4 were upregulated, being associated
31 their expression with a poor prognosis of cancer. In addition, subpopulations selected by differential adhesion
32 capability differed in the expression of several miRNAs, such as miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-21-5p, miR-93-
33 5p and/or miR-100-5p, which were also involved in EMT and/or cell self-renewal. Finally, *in vivo* studies in
34 NOD scid gamma (NSG) mice demonstrated that MDA-MB-231 breast cancer TS cells form more and bigger
35 xenograft tumors with shorter latency; and had higher metastatic potential when they were injected in the tail
36 vein. In conclusion, this work presents a new, non-aggressive, easy, cheap and reproducible methodology to
37 isolate prospectively cancer stem-like cells for subsequent biological studies, high throughput screening
38 therapeutic strategies targeting CSCs and preclinical assays.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49
50 The contributing authors are:

51 **Cynthia Morata-Tarifa, Gema Jiménez, María A. García, José M. Entrena, Carmen Griñán-Lisón,**
52 **Margarita Aguilera, Manuel Picon-Ruiz*, and Juan A. Marchal***
53
54

55
56 * Corresponding authors: Juan A. Marchal, M.D., Ph.D, Department of Human Anatomy and Embryology,
57 Faculty of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain, Ph: 958241000 Ext 20080,
58
59
60

1 jmarchal@ugr.es; Manuel Picon-Ruiz, Ph.D, Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami
2 Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA, Ph: 3052437294, m.piconruiz1@med.miami.edu
3
4

5 The authors would like to state the following:

- 6
7 1.- The data is original and the material here submitted has not been previously reported and is not under
8 consideration for publication elsewhere.
9
10 2.- The authors have no conflicting financial interests.
11
12 3.- All authors have read and agree with the present submission.
13
14 4.- The authors report no potential conflicts of interest.

15
16 Among the many knowledgeable reviewers you may have in mind, we would like to suggest the following for
17 their expertise in the field:
18

- 19
20 - Prof. Margot Zöller, University of Heidelberg (Germany); E-mail: m.zoeller@uni-hd.de
21
22 - Prof. Juan C. Izpisua Belmonte, Salk Institute for Biological Studies (U.S.A.); E-mail: belmonte@salk.edu
23
24 - Prof. Ron van Schaik, Medical Erasmus Center (Nederland); E-mail: r.vanschaik@erasmusmc.nl
25
26 - Prof. Malgorzata Czyz, Medical University of Łódź (Poland); E-mail: malgorzata.czyz@office365.umed.pl
27
28 - Prof. A. Giordano, University of Temple (U.S.A); E-mail: antonio.giordano@temple.edu
29
30 - Dr. Sergio Ruiz Macías, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO (Spain); E-mail:
31 sruizm@cni.es

32 We hope you find our work appealing and interesting enough and within *Stem Cells*'s scope to be considered
33 for external peer-review.

34 I appreciate beforehand for your time and consideration.

35 Looking forward to hearing from you at your convenience.
36
37
38
39

40 Yours Sincerely,

41
42
43 **Prof. Juan Antonio Marchal, MD., Ph.D**
44 Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER)
45 University of Granada
46 Centro de Investigación Biomédica
47 Avda del Conocimiento s/n. 18.100-Armilla. Granada, SPAIN
48 Phone: 00 34 958 249321
49 Fax: 00 34 958 246 296
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells

15
16
17
18
19
20
21
22
23

Cynthia Morata-Tarifa^{1,2}, Gema Jiménez^{1,2,3}, María A. García^{1,2,4}, José M. Entrena^{5,6}, Carmen Griñán-Lisón^{1,2}, Margarita Aguilera^{2,7}, Manuel Picon-Ruiz^{1,2,8}, and Juan A. Marchal^{1,2,3}

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

¹Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Granada, Spain. ²Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain. ³Department of Human Anatomy and Embryology, University of Granada, Granada, Spain. ⁴Department of Oncology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ⁵Institute of Neuroscience, Biomedical Research Center, University of Granada, Granada, Spain. ⁶Animal Behavior Research Unit, Scientific Instrumentation Center, University of Granada, Granada, Spain. ⁷Department of Microbiology, University of Granada, Granada, Spain. ⁸Braman Family Breast Cancer Institute, Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami, Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA.

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Corresponding Authors: Juan A. Marchal, M.D., Ph.D, Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain, Ph: 958241000 Ext 20080, jmarchal@ugr.es; Manuel Picon-Ruiz, Ph.D, Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA, Ph: 3052437294, m.piconruiz1@med.miami.edu

1
2
3 **Running Title:** Low adherent cancer cells show stemness properties
4
5
6

7 **Authors Contributions:**
8

9
10 **C.M-T.:** Conception and design, collection and/or assembly of data, data
11 analysis and interpretation, manuscript writing; **G.J., J.M.E., C.G-L.:** Collection
12 and/or assembly of data, data analysis and interpretation. **M.A.G.:** Data
13 analysis and interpretation, manuscript writing; **M.A.:** Financial support,
14 provision of study material; **M. P-R.:** Conception and design, collection and/or
15 assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing and final
16 approval of manuscript; **J.A.M.:** Conception and design, financial support,
17 administrative support, provision of study material, data analysis and
18 interpretation, manuscript writing and final approval of manuscript.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Financial Support:**
34

35
36 This work was supported in part by grants from the Instituto de Salud Carlos III
37 (FEDER funds, projects nº. PI10/02295 and PI10/02149) and by Consejería de
38 Economía, Innovación y Ciencia (Junta de Andalucía, excellence project
39 number CTS-6568) providing a fellowship granted to GJ.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Key words:** cancer stem-like cells, epithelial-to-mesenchymal transition,
49 metastasis, low-adherent, trypsin-sensitive
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Cancer stem cells are responsible for tumor progression, metastasis, therapy resistance and cancer recurrence, doing their identification and isolation of special relevance. Here we show that low adherent breast and colon cancer cells subpopulations have stem-like properties. Our results demonstrate that trypsin-sensitive (TS) breast and colon cancer cells subpopulations show increased ALDH activity, higher ability to exclude Hoechst 33342, enlarged proportion of cells with a cancer stem-like cell phenotype and are enriched in sphere- and colony-forming cells *in vitro*. Further studies in MDA-MB-231 breast cancer cells reveal that TS subpopulations express higher levels of *SLUG*, *SNAIL*, *VIMENTIN* and *N-CADHERIN* while show a lack of expression of *E-CADHERIN* and *CLAUDIN*, being this profile characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). In the TS subpopulation, *CXCL10*, *BMI-1* and *OCT4* are upregulated, being associated their expression with a poor prognosis of cancer. In addition, subpopulations selected by differential adhesion capability differ in the expression of several miRNAs, such as miR-34a-5p, miR-34c-5p, miR-21-5p, miR-93-5p and/or miR-100-5p, which are also involved in EMT and/or cell self-renewal. Furthermore, *in vivo* studies in NOD scid gamma (NSG) mice demonstrate that MDA-MB-231 TS cells form more and bigger xenograft tumors with shorter latency; and have higher metastatic potential when they were injected in the tail vein. In conclusion, this work presents a new, non-aggressive, easy, cheap and reproducible methodology to isolate prospectively cancer stem-like cells for subsequent biological and preclinical studies.

INTRODUCTION

The cancer stem cell (CSC) model posits that tumors are maintained by a subpopulation of cells that self-renew and yield heterogeneous progeny with reduced proliferative potential [1,2]. Different molecular mechanisms activated in normal stem cells are also involved in CSCs self-renewal, including the expression of certain embryonic stem cells-transcription factors (ES-TFs) [3] or the similar regulation of several signaling pathways [4,5]. Additionally, short non-coding miRNAs are also able to modulate gene expression programs to maintain self-renewal in normal and CSCs [6].

It is important to note that CSCs also underlie drug resistance, tumor recurrence and metastasis [1,2,7]. Drug resistance and tumor recurrence showed by CSCs are mainly explained by the overexpression of multidrug resistance (MDR) membrane proteins and the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH), or their ability to maintain a quiescent state [8]. On the other hand, metastasis is one of the most crucial steps in cancer progression and the main cause of mortality [1]. During local invasion and distant metastasis, the associated cancer cells typically develop alterations in their shape as well as in their attachment to other cells and to the extracellular matrix [9]. Metastatic cancer cells are characterized for suffering an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process by which cancer cells lose their attachment to the epithelial niche and acquire a mesenchymal phenotype [10]. These cells then are transported through the vasculature and are disseminated to anatomically distant organ sites where are able to establish new neoplastic growths [11,12].

The relevance of this cancer cell subpopulation has yield to develop methodologies for their identification and isolation. Breast CSCs are

1
2
3 characterized by the phenotype CD44⁺/CD24^{low/-} [13,14], while the expression of
4 the cell surface proteins CD133, CD44 and/or CD326 is related with colon
5 CSCs properties [15-17]. Other CSCs characteristics that have been
6 extensively used for their identification and isolation are their high ALDH activity
7 and ability to exclude Hoechst 33342, which is used to determine the side
8 population (SP) phenotype [1,18-21]. However, the isolation of CSCs based on
9 all of these properties requires the fluorescence-activated cell sorting (FACS)
10 method, an expensive and aggressive technique.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20
21 As it has been reported previously, cancer cells that undergo EMT acquire
22 characteristics of CSCs [22,23]. On the other hand, it is known that during EMT
23 process cells lose their adhesion ability with adjacent epithelial cells [9]. This
24 property has been extensively used to remove mesenchymal cells from primary
25 epithelial cell cultures following the protocol known as “differential trypsinization”
26 developed by Owens et al. in 1974 [24]. Here we report that the application of
27 this technique in cancer cell cultures shows that cells selected by differential
28 trypsinization differ in phenotypical and functional CSCs properties, including
29 ALDH activity, SP proportion, xenograft tumor formation ability and metastatic
30 potential, among others. As expected, trypsin-sensitive (TS) cancer cells
31 subpopulations show increased CSCs properties when compared with the total
32 population (TP) and/or the trypsin-resistant (TR) subpopulation.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell culture

Breast (MCF7 and MDA-MB-231) and colon (HT-29 and T84) cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured following ATCC recommendations.

Differential trypsinization

Cells at 60-80% of confluence were slowly washed with phosphate buffered saline (PBS) without directly flow falls on the cells. Then, 0.05% trypsin was added and incubated 2 minutes at 37°C. Detached cells were collected in centrifuge tubes and were named as Trypsin-Sensitive 1 (TS₁). The remaining attached cells were washed twice and, then, 0.25% trypsin was added. These cells were named as Trypsin-Resistant 1 (TR₁). On the other hand, TS₁ cells were again plated for 24 hours. After that, 0.05% trypsin was added and incubated for 2 minutes at 37°C. These detached cells were named as Trypsin-Sensitive 2 (TS₂) (Fig. 1A).

In order to separate more strictly cells with stem-like and no stem-like properties cells were grown until 60-80% of confluence and washed slowly with PBS. After obtaining the TS₁ subpopulation, remaining cells attached to the dishes were washed twice with PBS and incubated with 0.05% trypsin for 4 minutes at 37°C. Cells detached from this trypsinization were discarded. Dishes with remaining trypsin-resistant cells were named as TR₂ (Fig 1B). Total population (TP) was used as control cells.

Flow cytometry analyses

ALDEFLUOR assays (Stem Cell Technologies) to detect ALDH1 activity were performed according to manufacturer's instructions. Diethylaminobenzaldehyde (DEAB) was used as an ALDH1 inhibitor to set ALDH1 gates. Cell surface levels were determined with anti-human antibodies CD44-PE, CD24-APC, CD133-APC and CD326-FITC (Miltenyi Biotec). All samples were analyzed on a FACS CANTO II (BD Biosciences) using the FACS DIVA software.

Side population assays

Hoechst 33342 exclusion (Side Population) assays were carried out as previously described [21,25].

Sphere-forming assay

3×10^3 cells were washed with PBS and resuspended in spheres culture medium (DMEM:F12, 1% penicilin/streptomycin, B27, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ITS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hydrocortisone, 4 ng/mL Heparin, 10 ng/mL EGF, 20 ng/mL FGF) in ultra-low adherence 24-wells plates (Corning). Spheres $>75\mu\text{M}$ diameter were counted after 6 days by light microscopy.

Soft agar assay

10^4 cells were seeded in 0.4% cell agar base layer, which was on top of 0.8% base agar layer in 6-well culture plates. Cells were then incubated for a further

1
2
3 21 days at 37°C and 5% CO₂. Cell colony formation was then examined under
4
5 a light microscope after staining with 0.01% Crystal Violet (Sigma-Aldrich).
6
7
8
9

10 **qRT-PCR**

11
12 Total RNA extraction and qRT-PCR assays were done following standard
13
14 protocols. See Supplementary Material and Methods for more details. Primer
15
16 sequences are listed in Supplementary Table 1.
17
18
19

20 **Lentivirus transfections**

21
22
23
24
25
26 293T cells were co-transfected with a lentiviral vector encoding for the firefly
27
28 luciferase and the red fluorescent protein td-Tomato (L2T) (26), a packaging
29
30 vector (psPAX2) and an envelope vector (pCMV-VSVG) using lipofectamine
31
32 transfection reagent (Life Technologies). Viral particles produced from 293T
33
34 cells were collected and used to infect MDA-MB-231 cells. Briefly, supernatant
35
36 recovered after 48h from 293T transfected cells was filtered by a 0.45 µm pore
37
38 membrane and added to MDA-MB-231 plated cells supplemented with 4 µg/mL
39
40 polybrene (Sigma-Aldrich). After viral infection, td-Tomato⁺ cells were selected
41
42 for stable integration of the transfects by FACS.
43
44
45
46
47

48 **Mouse models**

49
50
51 Tumor-initiation experiments and experimental lung metastasis assays are
52
53 detailed in Supplementary Materials and Methods. All animal studies were
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 performed according to protocols reviewed and approved by the Institutional
4
5 Animal Care and Use Committee at the University of Granada.
6
7

8 9 10 **Histological and immunological analysis**

11
12 Described in detail in Supplementary Materials and Methods.
13
14
15
16
17

18 19 **Statistical analysis**

20
21 All graphed data are presented as mean \pm SD from at least three experiments.
22
23 two-tailed Student's t-tests and two-way ANOVA were used to determine
24
25 statistical differences for *in vitro* and *in vivo* experiments respectively. P-values
26
27 <0.05 were considered statistically significant in all cases.
28
29
30
31
32

33 **RESULTS**

34 35 **Trypsin-sensitive subpopulation displays CSCs-like phenotypic properties**

36
37 To test whether TS subpopulations are enriched in CSCs-like properties, we
38
39 determined the ALDH activity, the rate of SP and specific breast and colon
40
41 CSCs-related cell surface markers (Fig. 2). Regarding to ALDH activity, both
42
43 TS₁ and TS₂ subpopulations presented a significantly higher proportion of ALDH
44
45 positive cells than TP. In contrast, TR₁ subpopulation displayed a lesser ALDH
46
47 activity, although this change was not significant when compared to the TP (Fig.
48
49 2A, Supplementary Fig. S1A and Supplementary Table 2).
50
51
52
53
54

55 In agreement with the data obtained by Aldefluor assay, the rate of SP in TS
56
57 subpopulations was significantly higher than in both TP and TR₁ cells for all cell
58
59
60

1
2
3 lines tested. Thus, TS₁ cells showed values ranged from 48.6% up to 70.5%
4
5 and TS₂ from 82.3% up to 89.9%. However, TP cells displayed percentages
6
7 comprising between 3.9% and 13.2% (Fig. 2B, Supplementary Fig. S1B and
8
9 Supplementary Table 3).

10
11
12 Moreover, we determined CD44/CD24 expression for breast and
13
14 CD44/CD133/CD326 expression for colon cancer cell lines to study the
15
16 proportion of cancer cells with a CSC phenotype in the different subpopulations.
17
18 Flow cytometry analysis indicated that in the MCF7 cell line, TS₁ and TS₂
19
20 subpopulations showed a significantly higher CD44⁺/CD24⁻ proportion than TP
21
22 and TR₁ (Fig. 2C). However, no significant differences were found for these
23
24 markers in the different subpopulations of the MDA-MB-231 breast cancer cell
25
26 line, probably due to the high proportion of cells with this phenotype in the TP
27
28 (Fig. 2D). In HT-29 colon cancer cells, the expression of
29
30 CD44⁺/CD133⁺/CD326⁺ was significantly higher for TS₁ and TS₂ in comparison
31
32 to TR₁, although only TS₂ showed a significant increase in the proportion of
33
34 cells with this phenotype when compared to the TP (Fig. 2E). It is important to
35
36 note that HT-29 cells showed two different subpopulations based on CD326
37
38 expression, and that CD326^{high} and CD326⁻ HT-29 cells were separated
39
40 prospectively by differential trypsinization, being the TS subpopulation
41
42 composed for CD326^{high} cells (Supplementary Fig. S1C). In regards to T84
43
44 colon cancer cells, TS₁ and TS₂ showed a higher enrichment in cells with a
45
46 CD44⁺/CD326⁺ phenotype, even when their expression was studied together or
47
48 separate (Fig. 2F). Differences in the expression of CD133 were not significant;
49
50 however, this cell surface marker was more expressed in TS subpopulations
51
52 (Supplementary Fig. S1D).
53
54
55
56
57
58
59
60

Trypsin-sensitive subpopulation possesses higher self-renewal ability and clonogenicity

We next tested *in vitro* functional characteristics of these cell subpopulations isolated by differential trypsinization. We studied the anchorage-independent growth of TS and TR subpopulations under free-serum conditions to determine their self-renewal ability; and also the clonogenic capacity by colony-formation assay in soft agar. As it is shown in Fig. 3A and B, tumorspheres were formed more efficiently from TS₁ and TS₂ than TR₁ and TP cells in all cell lines; therefore TS subpopulations have a higher capacity of self-renewal. Moreover, TR₁ subpopulation formed significantly less spheres than TP for MCF7, MDA-MB-231 and T84 (Fig. 3A and B). In addition, TS subpopulations showed a significant higher capacity to form colonies in soft agar than TP for all cell lines studied (Fig. 3C).

Isolation of cancer cells with stem- and no stem-like properties based on their adhesion capacity

As we shown above, we obtained a cell subpopulation enriched for CSCs features based in their lower adhesion capacity to the cell culture surface. The amount of cells detached after the first trypsinization was very low and the rest of attached cells was very similar to the total population. For this reason, to demonstrate that it is possible to separate CSCs and cancer cells no stem based on their sensitivity to trypsin digestion, we developed another protocol. After the first trypsinization we recovered the TS₁ subpopulation and remaining

1
2
3 attached cells were trypsinized again with the same trypsin dilution indicated
4
5 above, but in this case for 4 minutes. Cells that were detached by this last
6
7 trypsinization were discarded and cells still attached were recovered and named
8
9 as TR₂, as described in the Material and Methods section (Fig. 1B). As it is
10
11 shown in Fig. 4A and Supplementary Fig. S2, TP and subpopulations TS₁ and
12
13 TR₂ differed in ALDH activity. In concrete, TS₁ subpopulation was enriched in
14
15 cells with a high ALDH activity, with purity higher than 90%, and TR₂ showed a
16
17 lack of ALDH activity in both MDA-MB-231 and MCF7 (Fig. 4A and
18
19 Supplementary Fig. S2). As it is shown the purity of ALDH⁺ cells obtained by
20
21 differential trypsinization from MCF7 cells was similar to the enrichment
22
23 obtained by FACS (Supplementary Fig. S2).
24
25
26
27
28
29

30 **Trypsin-sensitive subpopulation expresses higher levels of EMT- and** 31 **pluripotency- associated genes** 32 33 34

35 The enrichment of cancer cells with stem cell-like properties in cells which show
36
37 low adherence to plastic surface may be due to an EMT process, which is
38
39 associated with metastasis. To understand the molecular changes underlying
40
41 the different characteristics of these cell subpopulations, we analyzed the
42
43 expression of genes related with the EMT process and/or pluripotency on MDA-
44
45 MB-231 cells.
46
47

48
49 qRT-PCR studies demonstrated that all genes assayed were expressed
50
51 differentially in the TS₁ and the TR₂ cell subpopulations. *SNAIL*, *SLUG*,
52
53 *VIMENTIN*, *N-CADHERIN*, *CXCL10*, *OCT4* and *BMI1* were overexpressed in
54
55 the TS₁ subpopulation when compared to the TP, and underexpressed in the
56
57 TR₂ subpopulation (Fig. 4B). In contrast, expression levels of *CLAUDIN1* and *E-*
58
59
60

1
2
3 *CADHERIN* were higher in TR₂ cells and much lower in the TS₁ subpopulation
4
5 (Fig. 4B).
6

7
8 On the other hand, the expression patterns of several miRNAs related with EMT
9
10 and/or pluripotency also differ between these two cell subpopulations isolated
11
12 by differential trypsinization. The TR₂ subpopulation showed a significant
13
14 increase in the expression levels of miR-93-5p, miR-34a-5p, miR-100-5p and
15
16 miR-34c-5p (Fig. 4C). However, all of these miRNAs were downregulated in the
17
18 TS₁ subpopulation when compared to the TP, although not all of them were
19
20 statistically significant (Fig. 4C). In contrast, the expression of miR-21-5p was
21
22 higher in TS₁ and lower in TR₂ cells when compared to the TP (Fig. 4C).
23
24
25
26
27
28

29 **Trypsin-sensitive subpopulation is enriched in tumor-initiating cells**

30
31 To confirm the results observed *in vitro*, TS₁ and TR₂ subpopulations were
32
33 isolated from MDA-MB-231 cells, injected subcutaneously in NSG mice and
34
35 compared with the TP in a limiting dilution *in vivo* assay. The overall survival of
36
37 mice injected with TS₁ cells was lower than for the other groups (Fig. 5A). When
38
39 5×10^3 TS₁, TP or TR₂ cells were injected, the overall survival of mice was 63,
40
41 77 and 81 days, respectively (Fig. 5A). Furthermore, tumors volume was higher
42
43 after injection of TS₁ cells, while tumors formed by TR₂ cells were smaller (Fig.
44
45 5B). Similar results were observed when 1.5×10^4 cells were injected, however
46
47 the overall survival was shorter and the tumor size bigger for all groups, as it
48
49 was expected (Fig. 5A and B). All together, these data demonstrate that TS
50
51 cells are enriched in CSCs with a high tumor-initiating capacity while the TR
52
53 subpopulation is composed mainly of more differentiated cancer cells.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Trypsin-sensitive subpopulation generates more metastasis than trypsin-resistant subpopulation after tail vein injection

To further demonstrate the higher aggressiveness of the TS subpopulation, we compared the metastatic ability of both cell subpopulations isolated by differential trypsinization (TS₁ and TR₂) with the TP using MDA-MB-231 L2T cells. When 2.5×10^5 TS₁ cells were injected into the tail vein of NSG mice, 5 of 6 animals developed lung metastasis, however only 4 and 2 of 6 animals developed metastasis when TP or TR₂ cells, respectively, were injected (IVIS images from week 3 are shown in Fig 6A). In addition, the TS₁ subpopulation caused a more rapid increase in tumor bioluminescence, demonstrating their higher metastatic ability (Fig. 6A).

After 4 weeks, animals were sacrificed and lungs extirpated for further analysis (Fig 6B). Lungs from mice injected with TS₁ cells showed more pulmonary metastatic nodules than these from TP or TR₂ cells (representative images, Fig 6C). Furthermore, histological and immunohistochemical analysis of lungs demonstrated that metastatic nodules formed by TS₁ cells were bigger when compared to the TP, and smaller when TR₂ cells were injected (Fig. 6D and E). This further demonstrates the higher metastatic ability of the TS subpopulation and the features of more differentiated cancer cells of the TR subpopulation.

DISCUSSION

In this work, we demonstrate that cultured cancer cells possess low adherent cancer cell subpopulations with stemness properties. Therefore, differential trypsinization, an extended methodology for the establishment of primary epithelial cell cultures [24,27], can be applied to isolate breast and colon cancer cells with CSCs properties *in vitro* and *in vivo*, and likewise for other cancer types with an epithelial origin. In this work, we demonstrate that two distinct subpopulations of cancer cells can be isolated by this protocol: i) a subpopulation with CSCs properties and lower adherence ability (TS subpopulation); ii) and a highly adherent subpopulation enriched in more differentiated cancer cells (TR subpopulation).

Breast and colon cancer TS subpopulation is enriched in cells with high ALDH activity, and greater SP rate, being these characteristics associated with CSCs properties. The isolation of a subpopulation with high ALDH activity has been demonstrated to show higher tumorigenic potential in both breast and colon cancers [18,20]. Regarding to Hoechst 33342 dye efflux, different studies have shown that the SP phenotype is enriched in cancer stem-like cells in different tumors, including breast and colon cancers [19,21]. Moreover, the ability to exclude Hoechst 33342 is associated with an upregulation of ATP-binding cassette transporters that confer multidrug resistance, a characteristic of CSCs [28].

However, the characterization of CSCs by the expression of specific cell surface markers is the most extended method to identify and isolate this cancer cell subpopulation. We have demonstrated that MCF7 breast cancer cells from the TS subpopulation are enriched in cells with a CD44⁺/CD24⁻ phenotype, which is

1
2
3 characteristic of breast CSCs [13]. On the other hand, HT-29 and T84 TS colon
4 cancer cells are enriched in CD44⁺, CD133⁺ and/or CD326⁺ cells. Colon CSCs
5 were firstly identified based on the expression of CD133, being determined that
6 the ability to develop tumors in immunodeficient NOD/SCID was restricted to
7 CD133⁺ cells [15,16]. In a latter study, Dalerba et al. demonstrated that the
8 ability to engraft in immunodeficient mice was restricted to a minority
9 subpopulation CD326^{high}/CD44⁺. Furthermore, tumors originated from
10 CD326^{high}/CD44⁺ cells maintained a differentiated phenotype and reproduced
11 the full morphologic and phenotypic heterogeneity of their parental lesions [17].
12 Regarding to MDA-MB-231 TS cells, we did not see a significant increase in the
13 CD44⁺/CD24⁻ subpopulation, however the percentage in all groups was very
14 high, around 80%, which is in concordance with the highly invasive/metastatic
15 skills of this triple negative breast cancer cell line [29].

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Breast and colon cancer cells isolated by differential trypsinization also differ in their self-renewal ability. CSC self-renewal can be assayed *in vitro* by tumor spheres and holoclone colonies formation assays [30]. The TS subpopulation obtained from both breast and colon cancer cell lines generated more colonies in soft agar and sphere. It has been demonstrated that colon CSCs enriched in CD133⁺ cells form more colonies in soft agar used as indicator of their higher tumor-initiating ability [31]. In addition, it has been shown that MDA-MB-231 breast cancer cells enriched in cancer-initiating stem cells have higher colony-formation ability [32]. On the other hand, CSCs have the ability to form spheres in low-attachment culture surfaces under free serum conditions and this kind of culture conditions increases the percentage of cells with a CSC phenotype based on surface markers expression [25,33]. In contrast, the number of

1
2
3 colonies and spheres formed from TR cells was significantly lower than in the
4
5 TP, indicating the lower self-renewal ability and therefore, the more
6
7 differentiated status of this cancer cell subpopulation selected by a higher
8
9 adhesion capability to the cell culture surface.
10

11
12 All these *in vitro* studies for phenotypical and functional properties of CSCs
13
14 were notably increased in the TS subpopulations for all cell lines, except for
15
16 CD44⁺/CD24⁻ expression in MDA-MB-231 breast cancer cells that is basally
17
18 higher in TP cells. For this reason, we selected this cell line to perform further
19
20 studies. qRT-PCR analysis of different mRNA and miRNA related with EMT,
21
22 self-renewal and/or aggressiveness demonstrated differences in their
23
24 expression between TR and TS subpopulations. The gen profile of MDA-MB-
25
26 231 TS cells was more associated with a mesenchymal phenotype while the TR
27
28 subpopulation was more related with an epithelial phenotype. During the EMT
29
30 process, cancer cells lose their attachment to the epithelial niche and acquire a
31
32 mesenchymal phenotype which is characteristic of metastatic cancer cells [34].
33
34 Moreover, the triple-negative MDA-MB 231 breast cancer cell line, which
35
36 overexpress EGFR [35], has potent and reproducible migratory responses [36].
37
38 MDA-MB-231 TS cells showed a lack of expression of *E-CADHERIN* and
39
40 *CLAUDIN*. The loss by carcinoma cells of E-cadherin, a key cell-to-cell
41
42 adhesion molecule which establish adherent junctions with adjacent epithelial
43
44 cells, is the best characterized alteration during the EMT process [9,34]. In
45
46 regard to claudin expression, a phenotype claudin-low is associated with
47
48 enrichment for EMT markers, immune response genes, cancer stem cell-like
49
50 features and poor outcome in breast cancer [37]. In addition, the TS
51
52 subpopulation also shows a higher expression of several transcription factors
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that modulates the EMT, such as *SNAIL* or *SLUG*, and other mesenchymal
4
5 markers including *N-CADHERIN* and *VIMENTIN* [38]. In contrast, the
6
7 expression of these genes was contrary regulated in TR MDA-MB-231 cells,
8
9 indicating their more epithelial features. In fact, we have recently demonstrated
10
11 important role of Vimentin/Slug EMT markers in tumor growth of primary breast
12
13 cancer patient and in circulating tumor cells (CTC) EGFR+ from cytokeratin
14
15 negative non-metastatic breast cancer patients [39].
16
17

18
19 Certain ES-TFs, such as Oct4, Sox2 and Nanog, which are master regulators
20
21 of ES self-renewal and pluripotency, are also upregulated in CSCs [40]. *OCT4*
22
23 expression was measured in MDA-MB-231 cells, demonstrating that it is
24
25 overexpressed in the TS subpopulation. Interestingly, a recent study showed
26
27 that Oct4 is associated with poor prognosis and that positively regulate the EMT
28
29 process, contributing to breast cancer metastasis [38]. Furthermore, CSCs
30
31 share similarities with normal stem cells in the regulation of the Wnt, Notch and
32
33 Hedgehog signaling pathways, and the expression of several genes of the
34
35 polycomb family, including *BMI-1*, or the *HOX* family among others which are
36
37 involved in stem cells self-renewal [4]. *BMI-1*, which is overexpressed in TS
38
39 cells, has been also related with the EMT process and drug resistance [41].
40
41 Moreover, *CXCL10* is expressed in basal tumors as compared with ER+
42
43 tumors, being associated with a higher tumor grade and a poor prognosis of
44
45 breast cancer [42].
46
47
48

49
50 On the other hand, miRNAs play critical regulatory roles in a wide range of
51
52 biologic and pathologic processes, and miRNA expression profiling reveals
53
54 substantial differences between cancer and normal tissue, and among different
55
56 cancer types [43]. We studied the expression patterns of different miRNAs that
57
58
59
60

1
2
3 have been previously shown to be related with CSCs properties, EMT,
4 metastasis and poor outcome. For example, the TR subpopulation
5 overexpresses miR-93, which inhibit cell proliferation, the capacity to form
6 colonies [44] and promotes mesenchymal-to-epithelial transition (MET) [45].
7 miR-34a-5p and miR-34c-5p are downregulated in TS cells and upregulated in
8 the TR subpopulation. miR-34 family are reportedly tumor-suppressor miRNAs
9 implicated in reduced cancer stem cell properties and increased sensitivity to
10 drug treatment by directly targeting NOTCH1 [46]. miR-100 is also upregulated
11 in the TR subpopulation, and its expression levels relate to the cellular
12 differentiation state, with lowest expression in cells displaying stem cell markers
13 [47]. In addition, the expression of miR-21, a well known miRNA which is
14 dysregulated in several types of cancer and plays a key role in carcinogenesis,
15 recurrence and metastasis [48], is increased in the TS subpopulation and
16 decreased in TR cells.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 All together, these data demonstrate that differential trypsinization of breast and
35 colon cancer cell cultures allows the isolation of two subpopulations (TR and
36 TS) that differ in their cancer stem-like cells properties. TS cells show increased
37 ALDH activity, SP proportion and CSCs-like phenotype. This subpopulation is
38 enriched in cells that have followed an EMT process and possess high self-
39 renewal ability. Moreover, TS cells show higher tumorsphere- and colony-
40 formation ability *in vitro*; and tumorigenic and metastatic potential *in vivo*. In
41 contrast, the TR subpopulation is mainly composed by more differentiated
42 cancer cells with a lower tumorigenic capacity both *in vitro* and *in vivo*. In a
43 previous study carried-out by Walia and Elbe, it was shown that the TS
44 subpopulation, obtained by differential trypsinization from transformed human
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 mammary epithelial cells, was enriched in stem cell properties [49]. In a more
4
5 recent study, this methodology was used to isolate a subpopulation of cells with
6
7 a mesenchymal phenotype from an oncogenic transformed human mammary
8
9 epithelial cell line [50]. However, these studies were limited to determine EMT
10
11 markers expression, mammosphere-forming ability, drug resistance and
12
13 CD44/CD24 expression, and were carried-out in a well differentiated oncogenic
14
15 transformed human mammary epithelial cell line.
16
17
18
19
20

21 **CONCLUSION**

22
23
24 In summary, our results evidence that cultured cancer cells possess low
25
26 adherent cell subpopulations with stemness properties and with high
27
28 tumorigenic and metastatic abilities. We show for the first time that differential
29
30 trypsinization, a new, non-aggressive, easy, cheap and reproducible
31
32 methodology to isolate prospectively breast and colon cancer stem-like cells for
33
34 subsequent biological studies, high throughput screening therapeutic strategies
35
36 targeting CSCs and preclinical assays.
37
38
39
40
41
42

43 **Acknowledgements:**

44
45 We thanks Dr Gambhir's laboratory from the Standford University for provide us
46
47 L2T plasmid.
48
49

50
51 **Conflict of Interest:** None declared
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J* 2013;27(1):13-24.
2. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol* 2009;19(2):71-77.
3. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, et al. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells* 2014;3(2):74-82.
4. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66(12):6063-6071.
5. O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010;16(12):3113-3120.
6. Chhabra R, Saini N. MicroRNAs in cancer stem cells: current status and future directions. *Tumour Biol* 2014;35(9):8395-8405.
7. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):717-728.
8. Raha D, Wilson TR, Peng J, et al. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res* 2014;74(13):3579-3590.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674.

- 1
2
3 10. Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell
4 dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog* 2014;19(5):349-
5 361.
6
7
- 8
9 11. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer
10 metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010;70(14):5649-5669.
11
- 12 12. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and
13 evolving paradigms. *Cell* 2011;147(2):275-292.
14
- 15 13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective
16 identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S*
17 *A* 2003;100(7):3983-3988.
18
- 19 14. Azzam DJ, Zhao D, Sun J, et al. Triple negative breast cancer initiating
20 cell subsets differ in functional and molecular characteristics and in
21 gamma-secretase inhibitor drug responses. *EMBO Mol Med*
22 2013;5(10):1502-1522.
23
- 24 15. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell
25 capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*
26 2007;445(7123):106-110.
27
- 28 16. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion
29 of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445(7123):111-115.
30
- 31 17. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human
32 colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*
33 2007;104(24):10158-10163.
34
- 35 18. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of
36 normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of
37 poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1(5):555-567.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19. Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell* 2006;19(1):24-29.
20. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69(8):3382-3389.
21. Britton KM, Kirby JA, Lennard TW, et al. Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis. *Cancers (Basel)* 2011;3(2):2106-2130.
22. Liu X, Fan D. The Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: Functional and Mechanistic Links. *Curr Pharm Des* 2014. (in press)
23. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704-715.
24. Owens RB, Smith HS, Hackett AJ. Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice. *J Natl Cancer Inst* 1974;53(1):261-269.
25. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010;9:212.
26. Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(42):18115-18120.
27. Garcia-Posadas L, Arranz-Valsero I, Lopez-Garcia A, et al. A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(10):7143-7152.

- 1
- 2
- 3 28. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, et al. Role of breast cancer resistance
- 4 protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*
- 5 2012;83(8):1084-1103.
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10 29. Xu J, Prosperi JR, Choudhury N, et al. beta-Catenin Is Required for the
- 11 Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One*
- 12 2015;10(2):e0117097.
- 13
- 14
- 15
- 16 30. Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, et al. Maintenance of stem cell self-
- 17 renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3beta
- 18 influenced by CD44 and RHAMM. *Stem Cells* 2013;31(10):2073-2083.
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23 31. Puglisi MA, Sgambato A, Saulnier N, et al. Isolation and characterization
- 24 of CD133+ cell population within human primary and metastatic colon
- 25 cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13 Suppl 1:55-62.
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30 32. Zhao D, Pan C, Sun J, et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells
- 31 through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2.
- 32 *Oncogene* 2014. (in press)
- 33
- 34
- 35
- 36 33. Rappa G, Mercaide J, Anzanello F, et al. Growth of cancer cell lines
- 37 under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic
- 38 targets. *Exp Cell Res* 2008;314(10):2110-2122.
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43 34. Cervantes-Arias A, Pang LY, Argyle DJ. Epithelial-mesenchymal
- 44 transition as a fundamental mechanism underlying the cancer
- 45 phenotype. *Vet Comp Oncol* 2013;11(3):169-184.
- 46
- 47
- 48
- 49 35. Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as
- 50 a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*
- 51 2009;20(5):862-867.
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3 36. Price JT, Tiganis T, Agarwal A, et al. Epidermal growth factor promotes
4 MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol
5 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res*
6 1999;59(21):5475-5478.
7
- 8
9
10
11 37. Sabatier R, Finetti P, Guille A, et al. Claudin-low breast cancers: clinical,
12 pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer*
13 2014;13:228.
14
- 15
16
17
18 38. Wang D, Lu P, Zhang H, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-
19 mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated
20 with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*
21 2014;5(21):10803-10815.
22
- 23
24
25
26
27 39. Serrano MJ, Ortega FG, Alvarez-Cubero MJ, et al. EMT and EGFR in
28 CTCs cytokeratin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget*
29 2014;5(17):7486-7497.
30
- 31
32
33
34 40. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem
35 cells: small genes make a big difference. *Chin J Cancer* 2013;32(9):483-
36 487.
37
- 38
39
40
41 41. Paranjape AN, Balaji SA, Mandal T, et al. Bmi1 regulates self-renewal
42 and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through
43 Nanog. *BMC Cancer* 2014;14:785.
44
- 45
46
47
48 42. Mulligan AM, Raitman I, Feeley L, et al. Tumoral lymphocytic infiltration
49 and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the
50 Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin Cancer Res*
51 2013;19(2):336-346.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
- 2
- 3 43. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify
- 4 human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-838.
- 5
- 6
- 7 44. Leal JA, Lleonart ME. MicroRNAs and cancer stem cells: therapeutic
- 8 approaches and future perspectives. *Cancer Lett* 2013;338(1):174-183.
- 9
- 10
- 11 45. Liu S, Clouthier SG, Wicha MS. Role of microRNAs in the regulation of
- 12 breast cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*
- 13 2012;17(1):15-21.
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18 46. Park EY, Chang E, Lee EJ, et al. Targeting of miR34a-NOTCH1 Axis
- 19 Reduced Breast Cancer Stemness and Chemoresistance. *Cancer Res*
- 20 2014;74(24):7573-7582.
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25 47. Deng L, Shang L, Bai S, et al. MicroRNA100 inhibits self-renewal of
- 26 breast cancer stem-like cells and breast tumor development. *Cancer Res*
- 27 2014;74(22):6648-6660.
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32 48. Liu J, Zhu H, Yang X, et al. MicroRNA-21 is a novel promising target in
- 33 cancer radiation therapy. *Tumour Biol* 2014;35(5):3975-3979.
- 34
- 35
- 36 49. Walia V, Elble RC. Enrichment for breast cancer cells with
- 37 stem/progenitor properties by differential adhesion. *Stem Cells Dev*
- 38 2010;19(8):1175-1182.
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43 50. Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, et al. Protein kinase C alpha is a central
- 44 signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells.
- 45 *Cancer Cell* 2013;24(3):347-364.
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Differential trypsinization protocols. (A) Isolation of TS₁, TS₂ and TR₁ subpopulations, used for Aldefluor assays, Hoechst 33342, surface markers, spheres and colonies formation ability. **(B)** Improved protocol to isolate highly attached cells (TR₂) used for Aldefluor, qRT-PCR and *in vivo* assays. Red balls represent cells with CSCs-like properties and green balls cells with a more differentiate phenotype.

Figure 2. Phenotypic properties of breast and colon cancer cell subpopulations isolated by differential adhesion. Percentage of ALDH⁺ **(A)** and SP **(B)** cells determined in subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-29 and T84 cancer cell lines. **(C, D)** Percentage of CD44⁺/CD24⁻ cells in TR₁, TP, TS₁ and TS₂ isolated from MCF7 **(C)** and MDA-MB-231 **(D)** breast cancer cells measured by flow cytometry. **(E)** Co-expression of CD44, CD133 and CD326 in HT-29 cells isolated by differential trypsinization and in the TP. **(F)** Flow cytometry for CD44 and CD326 expression, alone or together, in T84 cells. Data are graphed as mean ± SD from at least two different experiments carried-out by triplicates (**P<0.01; *P<0.05). See also Supplementary Figure S1.

Figure 3. Tumorsphere- and colony-forming ability of breast and colon cancer cell subpopulations isolated by differential trypsinization. (A) Representative images of mammospheres formed from different MCF7 subpopulations. **(B)** Number of spheres formed by different subpopulations of

1
2
3 each cell line. **(C)** Number of colonies formed by TP and TS1 of each cell line.
4
5 Data are represented as mean \pm SD (**P<0.01;*P<0.05).
6
7
8
9

10
11 **Figure 4. ALDH activity, mRNA and miRNA expression in enriched**
12 **subpopulations of MDA-MB-231 cells isolated by their different adhesion**
13 **capacity. (A)** Aldefluor assay performed in TR2, TP and TS1 MDA-MB-231
14 **cells. See also Supplementary Figure S2. (B)** qRT-PCR analysis for the
15 expression of CSCs and EMT-related genes in different subpopulations of
16 MDA-MB-231 cells. Data are normalized to 1 for TP using GAPDH as internal
17 control, and graphed as mean \pm SEM (n=3) (**P<0,01;*P<0,05). **(C)** Differential
18 expression of miRNAs related to CSC phenotype and/or EMT in MDA-MB-231
19 cells isolated by differential trypsinization. Data are normalized to 1 for TP using
20 miR-24c-3p as internal control, and graphed as mean \pm SEM (n=3)
21 (**P<0.01;*P<0.05).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Figure 5. Limiting dilution assay for subcutaneous xenograft tumor**
39 **formation. (A)** Kaplan-Meier curve for overall survival of NSG mice injected
40 with 5×10^3 cells (left) and 1.5×10^4 cells (right) from TS₁, TR₂ or TP. **(B)** Tumor
41 volume (mm³) of subcutaneous xenograft tumors formed by 5×10^3 and $1.5 \times$
42 10^4 cells from TS₁, TR₂ and TP in NSG mice. Data are shown as mean \pm SEM
43 (**P<0.01;*P<0.05).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Figure 6. Experimental lung metastasis assay. (A)** IVIS images of lung
56 metastasis formed after tail vein injection of TP, TR₂ and TS₁ MDA-MB-231 L2T
57
58
59
60

1
2
3 cells (up). Measure of photon flux is graphed as mean \pm SEM (down). **(B)**
4
5 Fluorescence of metastatic lungs *ex vivo*. **(C)** Representative optical images of
6
7 lung metastasis for a healthy mice (control) and lungs extracted from NSG mice
8
9 injected with different subpopulations of MDA-MB-231 cells obtained by
10
11 differential trypsinization. **(D, E)** Histological **(D)** and immunohistochemical **(E)**
12
13 images of lungs obtained from healthy mice (control) and mice injected with
14
15 TR₂, TP and TS₁ cells (left to right).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE 1
Marchal, JA

Top

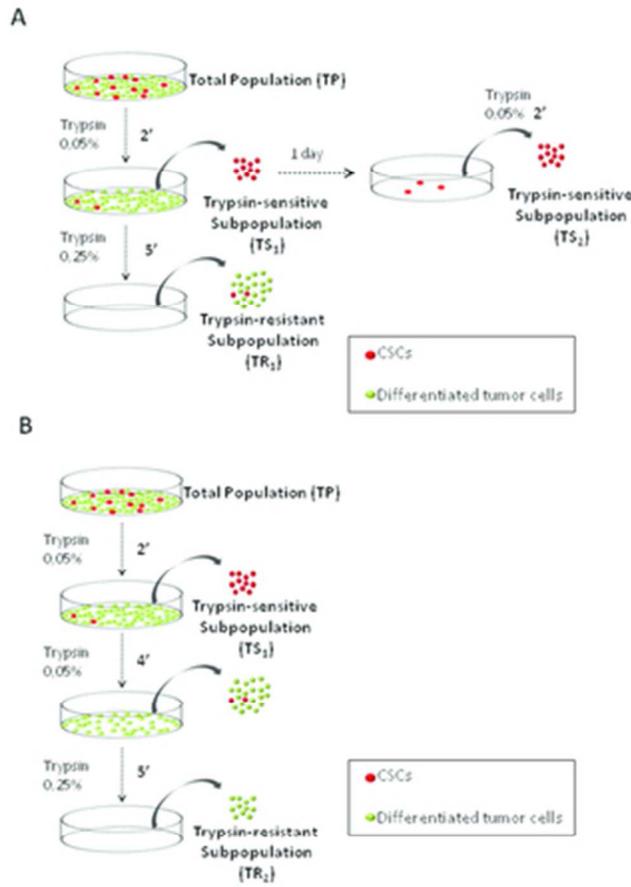


Figure 1. Differential trypsinization protocols. (A) Isolation of TS1, TS2 and TR1 subpopulations, used for Aldefluor assays, Hoechst 33342, surface markers, spheres and colonies formation ability. (B) Improved protocol to isolate highly attached cells (TR2) used for Aldefluor, qRT-PCR and in vivo assays. Red balls represent cells with CSCs-like properties and green balls cells with a more differentiate phenotype. 33x45mm (300 x 300 DPI)

FIGURE 2
Marchal, JA

Top

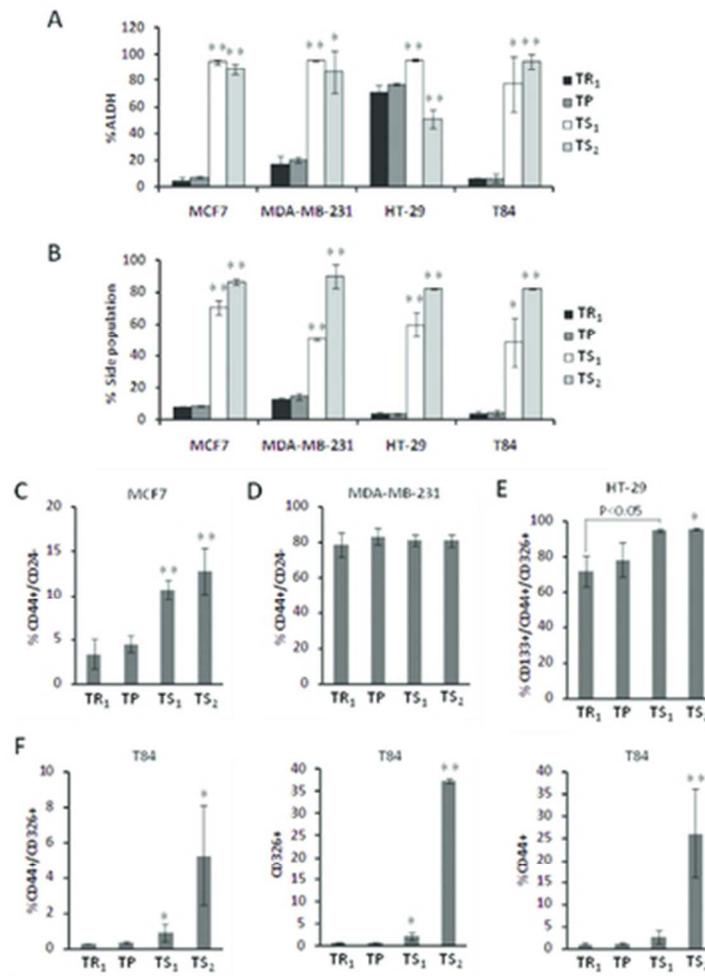


Figure 2. Phenotypic properties of breast and colon cancer cell subpopulations isolated by differential adhesion. Percentage of ALDH⁺ (A) and SP (B) cells determined in subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-29 and T84 cancer cell lines. (C, D) Percentage of CD44⁺/CD24⁻ cells in TR₁, TP, TS₁ and TS₂ isolated from MCF7 (C) and MDA-MB-231 (D) breast cancer cells measured by flow cytometry. (E) Co-expression of CD44, CD133 and CD326 in HT-29 cells isolated by differential trypsinization and in the TP. (F) Flow cytometry for CD44 and CD326 expression, alone or together, in T84 cells. Data are graphed as mean \pm SD from at least two different experiments carried-out by triplicates (**P<0.01; *P<0.05). See also Supplementary Figure S1.
33x45mm (300 x 300 DPI)

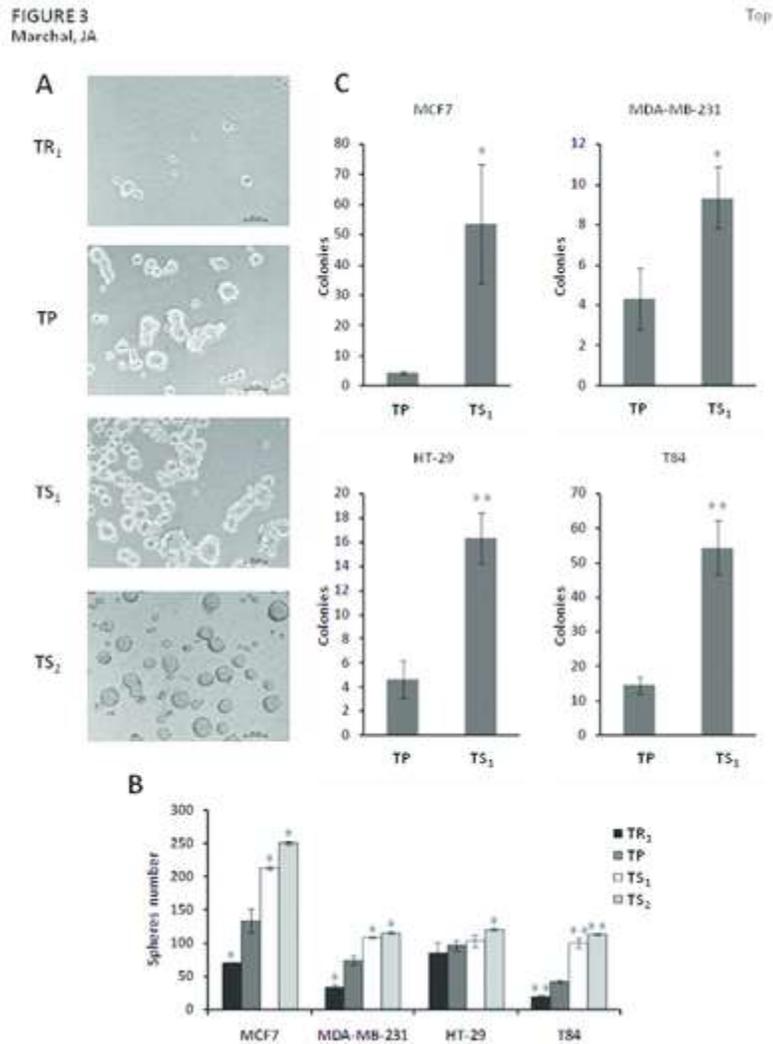


Figure 3. Tumorsphere- and colony-forming ability of breast and colon cancer cell subpopulations isolated by differential trypsinization. (A) Representative images of mammospheres formed from different MCF7 subpopulations. (B) Number of spheres formed by different subpopulations of each cell line. (C) Number of colonies formed by TP and TS1 of each cell line. Data are represented as mean \pm SD (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). 33x45mm (300 x 300 DPI)

FIGURE 4
Marchal, JA

Top

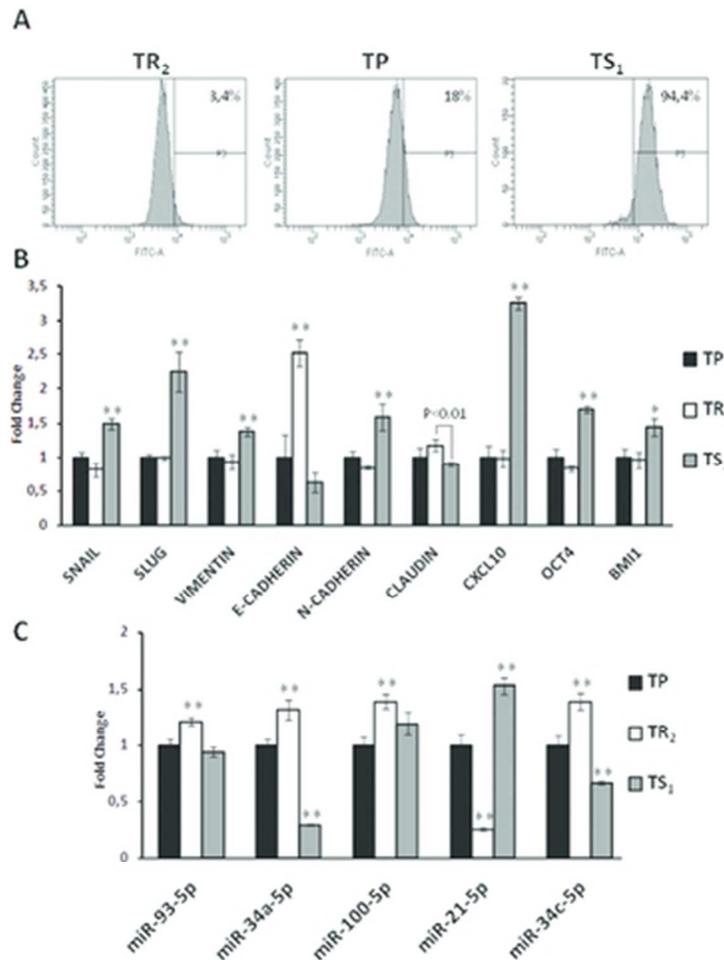


Figure 4. ALDH activity, mRNA and miRNA expression in enriched subpopulations of MDA-MB-231 cells isolated by their different adhesion capacity. (A) Aldefluor assay performed in TR₂, TP and TS₁ MDA-MB-231 cells. See also Supplementary Figure S2. (B) qRT-PCR analysis for the expression of CSCs and EMT-related genes in different subpopulations of MDA-MB-231 cells. Data are normalized to 1 for TP using GAPDH as internal control, and graphed as mean \pm SEM (n=3) (**P<0,01; *P<0,05). (C) Differential expression of miRNAs related to CSC phenotype and/or EMT in MDA-MB-231 cells isolated by differential trypsinization. Data are normalized to 1 for TP using miR-24c-3p as internal control, and graphed as mean \pm SEM (n=3) (**P<0.01; *P<0.05).

33x45mm (300 x 300 DPI)

FIGURE 5
Marchal, JA

Top

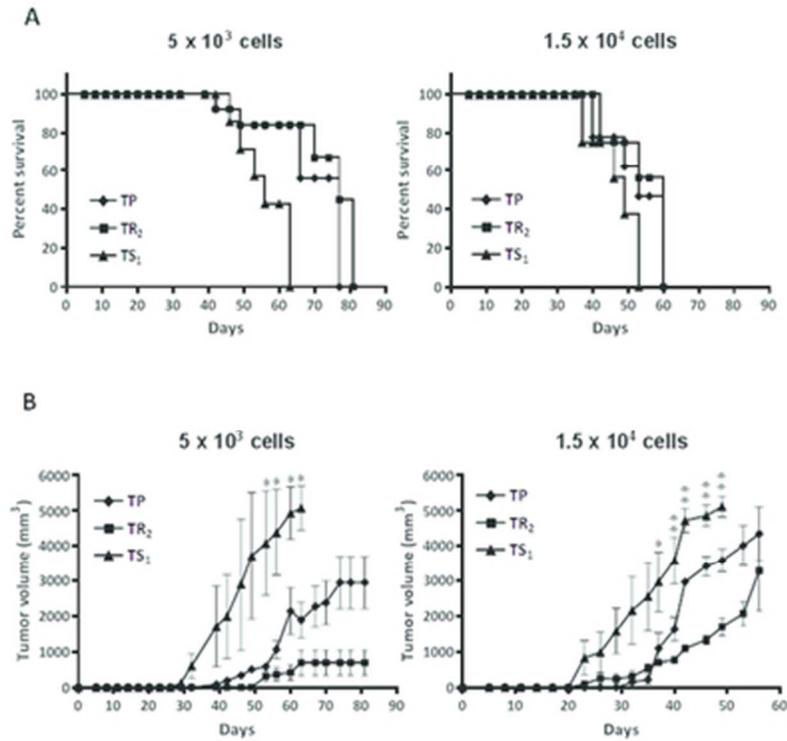


FIGURE 5

Figure 5. Limiting dilution assay for subcutaneous xenograft tumor formation. (A) Kaplan-Meier curve for overall survival of NSG mice injected with 5 x 10³ cells (left) and 1.5 x 10⁴ cells (right) from TS₁, TR₂ or TP. (B) Tumor volume (mm³) of subcutaneous xenograft tumors formed by 5 x 10³ and 1.5 x 10⁴ cells from TS₁, TR₂ and TP in NSG mice. Data are shown as mean ± SEM (**P<0.01; *P<0.05).
33x45mm (300 x 300 DPI)

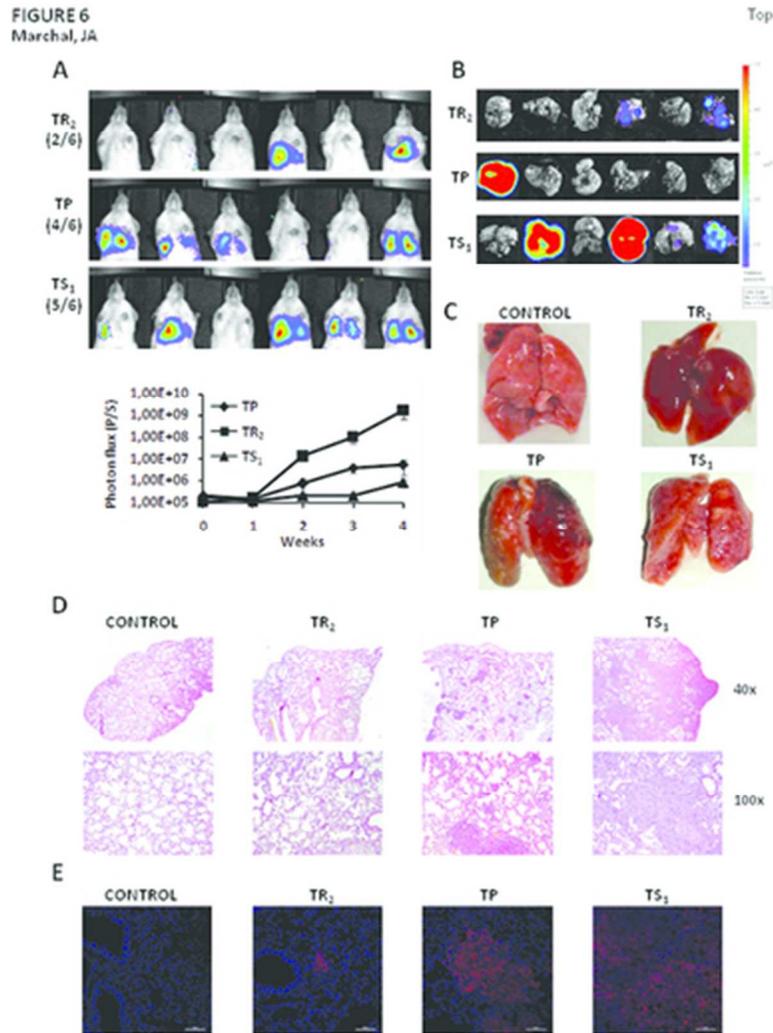


Figure 6. Experimental lung metastasis assay. (A) IVIS images of lung metastasis formed after tail vein injection of TP, TR2 and TS1 MDA-MB-231 L2T cells (up). Measure of photon flux is graphed as mean \pm SEM (down). (B) Fluorescence of metastatic lungs ex vivo. (C) Representative optical images of lung metastasis for a healthy mice (control) and lungs extracted from NSG mice injected with different subpopulations of MDA-MB-231 cells obtained by differential trypsinization. (D, E) Histological (D) and immunohistochemical (E) images of lungs obtained from healthy mice (control) and mice injected with TR2, TP and TS1 cells (left to right).

33x45mm (300 x 300 DPI)

SUPPLEMENTARY DATA

MATERIALS AND METHODS

qRT-PCR

Total RNA from the different cell lines was extracted using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Limburgo, Netherland) following the instructions of the manufacturer. Reverse transcription were realized using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for mRNA and miRCURY LNA™ Synthesis kit II (Exiqon, Vedbaek, Denmark) for miRNAs. qRT-PCR assay was done using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) and miRCURY LNA™ EXILENT SYBR Green (Exiqon) for miRNAs. Amplification of target cDNAs was performed using CFX96 real-time PCR detection (Bio-Rad). Each reaction was performed in triplicate. The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the amplification factor. Human GADPH and hsa-miR-24c-3p were used as housekeeping. The standard curve was constructed by 5-fold serial dilutions of cDNA from 1 µg.

Mouse models

Xenograft in vivo assays

All *in vivo* experiments were performed in female NOD scid gamma mice (NSG, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) purchased from Charles River (Barcelona, Spain). Animal welfare and experimental procedures were carried out in accordance with institutional (Research Ethics Committee of the University of

1
2
3 Granada, Spain) and international standards (European Communities Council
4 directive 86/609). All animals (n= 6 per group) were maintained in a
5
6
7 microventilated cage system with a 12h light/dark cycle, and they were
8
9
10 manipulated in a laminar air-flow cabinet to keep on the specific pathogen-free
11
12 conditions. For the induction of tumors, mice were anesthetized by inhalation of
13
14 isoflurane, inoculated with 5×10^3 or 1.5×10^4 MDA-MB-231 cells by
15
16 subcutaneously injection into the flank regions. Tumor growth was assessed
17
18 twice weekly using a digital caliper and the tumor volume was calculated by the
19
20 formula $V = (\text{length})^2 \times \text{width} \times \pi / 6$.
21
22
23
24
25

26 Experimental lung metastasis *in vivo* assay

27
28 2.5×10^5 MDA-MB-231 L2T cells were injected into the tail vein of 4-6 weeks
29
30 old female NSG mice (n=6 per group). Bioluminescence was monitored by IVIS
31
32 at day 0 and weekly by injecting intraperitoneally 150 mg/kg of D-Luciferine
33
34 (Thermo Fisher). After 4 weeks, mice were euthanized and lungs were excised,
35
36 photographed for td-Tomato expression and assayed for luciferase activity
37
38 washing lungs with 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of D-luciferine diluted in PBS. Excised lungs
39
40 were also used for Hematoxylin and Eosin staining and confocal microscopy
41
42 analysis.
43
44
45
46
47
48
49

50 **Histological analysis**

51
52 Lungs were immersed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 4h at 4°C,
53
54 washed in 0.1M PBS and embedded in paraffin in an automatic tissue
55
56 processor (TP1020, Leica, Germany). The paraffin blocks were cut into 4mm
57
58
59
60

1
2
3 sections for staining. Sections were deparaffinized with xylene and hydrated
4
5 with decreasing alcohol concentrations (absolute to 70%), and stained with
6
7 hematoxylin-eosin. Later, sections were dehydrated with increasing alcohol
8
9 concentrations (95% to absolute), were cleared with xylene and mounted with
10
11 mounting medium. Observation under light microscopy and digital image
12
13 acquisition was carried out with an inverted microscope (Nikon H550s).
14
15
16
17
18

19 **Immunohistochemical analysis**

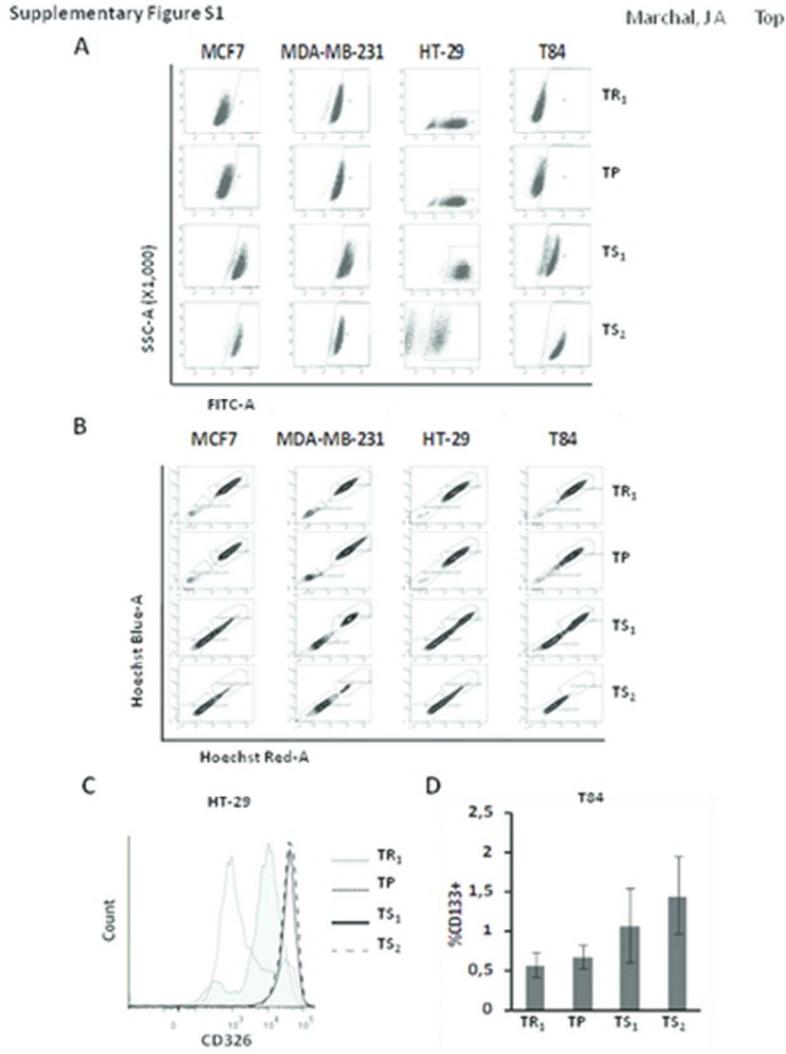
20
21 Lungs were immersed in 10% formaline at room temperature overnight, washed
22
23 in 0.1M PBS, and preserved in 30% sucrose in PBS for 24h. Then, the material
24
25 were soaked in OCT compound (Sakura Finitek Europe B.V., Netherlands),
26
27 frozen in liquid nitrogen and blocks were stored at -40°C until use. The OCT
28
29 blocks were cut into 8 mm sections and collected on SuperFrost slides (Menzel-
30
31 Glasser, Germany). The sections were hydrated with PBS and mounted with
32
33 mounting medium with DAPI. Observation under fluorescent microscopy and
34
35 digital image acquisition was carried out with a confocal microscope (Nikon A1).
36
37
38
39
40
41
42

43 **Supplementary figure legends**

44
45 **Supplementary Figure S1.** Dot-plot image and percent of ALDH⁺(**A**) and SP
46
47 (**B**) cells of TR₁, TP, TS₁ and TS₂ subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-
48
49 29 and T84. (**C**) CD326 change in TR₁, TP, TS₁ and TS₂ of HT-29. (**D**)
50
51 Proportion of CD133⁺ cells for the different subpopulations of T84. Data shown
52
53 as mean ± SD (**P<0.01;*P<0.05).
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Supplementary Figure S2.** Rate of ALDH+ cells for different subpopulations of
4
5 MCF7 obtained by the method describe in Fig 1B. Data shown as mean \pm SD
6
7 (**P<0.01;*P<0.05).
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

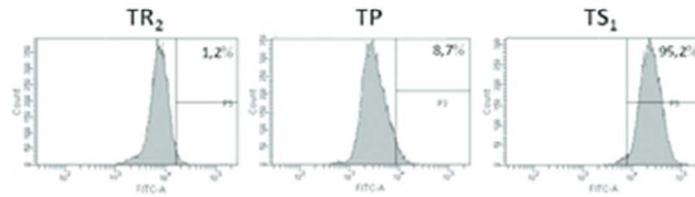


Supplementary Figure S1. Dot-plot image and percent of ALDH+(A) and SP (B) cells of TR1, TP, TS1 and TS2 subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-29 and T84. (C) CD326 change in TR1, TP, TS1 and TS2 of HT-29. (D) Proportion of CD133+ cells for the different subpopulations of T84. Data shown as mean ± SD (**P<0.01; *P<0.05).

33x45mm (300 x 300 DPI)

Supplementary Figure S2

Marchal, JA Top



Supplementary Figure S2. Rate of ALDH+ cells for different subpopulations of MCF7 obtained by the method describe in Fig 1B. Data shown as mean \pm SD (**P<0.01;*P<0.05).
33x45mm (300 x 300 DPI)

SUPPLEMENTARY DATA**TABLES****Supplementary Table 1.** Primer sequences used to qRT-PCR in different subpopulation of MDA-MB-231

Gene	Primer Sequence	
CLAUDIN1	Forward	5' GCGCGATATTTCTTCTTGCAGG 3'
	Reverse	5' TTCGTACCTGGCATTGACTGG 3'
CXCL10	Forward	5' CCAGAATCGAAGGCCATCAA 3'
	Reverse	5' CATTTCCTTGCTAACTGCTTTCAG 3'
SNAIL	Forward	5' ACCCCACATCCTTCTCACTG 3'
	Reverse	5' TACAAAACCCACGCAGACA 3'
SLUG	Forward	5' TGCGATGCCCAGTCTAGAAA 3'
	Reverse	5' TTCTCCCCCGTGTGAGTTC 3'
E-CADHERIN	Forward	5' AATTCCTGCCATTCTGGGGA 3'
	Reverse	5' TCTTCTCCGCCTCCTTCTTC 3'
N-CADHERIN	Forward	5' TGAGCCTGAAGCCAACCTTA 3'
	Reverse	5' AGGTCCCCTGGAGTTTTCTG 3'
VIMENTIN	Forward	5' AGCTAACCAACGACAAAGCC 3'
	Reverse	5' TCCACTTTGCGTTCAAGGTC 3'
BMI1	Forward	5' GCTGCCAATGGCTCTAATGAA 3'
	Reverse	5' TGCTGGGCATCGTAAGTATCTT 3'
OCT4	Forward	5' CACCATCTGTCGCTTCGAGG 3'
	Reverse	5' AGGGTCTCCGATTTGCATATCT 3'

Supplementary Table 2. Percentage of ALDH⁺ cells determined in subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-29 and T84 cancer cell lines. Data shows as mean ± SD.

	MCF7	MDA-MB-231	HT-29	T84
TR₁	4.90±2.83	17.30±5.80	71.00±5.04	6.80±0.15
TP	7.55±0.78	20.50±1.98	76.77±0.74	6.90±3.39
TS₁	94.35±1.77	95.50±0.42	95.70±0.82	77.40±21.35
TS₂	88.90±4.10	86.50±16.40	50.83±6.89	94.55±5.87

Supplementary Table 3. Percentage of SP determined in subpopulations of MCF7, MDA-MB-231, HT-29 and T84 cancer cell lines. Data shows as mean ± SD.

	MCF7	MDA-MB-231	HT-29	T84
TR₁	8.05±0.35	13.20±0.85	4.10±0.71	3.90±1.55
TP	8.75±0.64	14.70±2.12	3.60±0.42	4.85±1.77
TS₁	70.50±4.38	50.55±0.64	59.75±7.57	48.65±15.63
TS₂	86.45±1.77	89.90±7.50	82.35±0.21	82.60±0.28



**p-Nitrobenzenesulfonamides and their Fluorescent
Dansylsulfonamides derived from N-Alkylated o-(Purine-
Methyl)Anilines as Novel Anti-Cancer Agents**

Journal:	<i>ChemComm</i>
Manuscript ID:	CC-COM-04-2015-003124
Article Type:	Communication
Date Submitted by the Author:	15-Apr-2015
Complete List of Authors:	Morales, Fatima; University of Granada, CONEJO-GARCÍA, ANA; UNIVERSIDAD DE GRANADA, QUÍMICA FARMACEÚTICA Y ORGÁNICA; Ramirez, A; University of Jaen, Morata, C; University of Granada, Marchal, Juan; Facultad de Medicina, Avenida de Madrid s/n, 18071 Granada, Spain, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana Campos, Joaquin; Campus de Cartuja , Facultad de Farmacia
Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.	
A375 + DANSYL +DIC.wmv A375 + DANSYL.wmv	

Prof. Joaquín Campos
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
c/ Campus de Cartuja s/n
18071 Granada (Spain)
Phone No.: +34 958 243850
Fax No.: +34 958 243845
E-mail: jmcampos@ugr.es

Chem. Commun.

Subject: **Online submission**

Granada April 9th 2015

Dear Sir,

Enclosed you will find our manuscript entitled “***p*-Nitrobenzenesulfonamides and their Fluorescent Dansylsulfonamides derived from *N*-Alkylated *o*-(Purine-Methyl)Anilines as Novel Anti-cancer Agents**”, written by Fátima Morales, Ana Conejo-García, Alberto Ramírez, Cynthia Morata, Juan Antonio Marchal, and Joaquín M. Campos for its publication in *Chem. Commun.* if you think it advisable.

All authors have approved the final article version. All the authors have materially participated in the research and/or in the article preparation. The work described herein has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere, its publication is approved by all authors and tacitly by the responsible authorities where the work has been carried out, and, if accepted, will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

The reasons for publication in *Chem. Commun.* are the following:

In the preparation of a cyclic *O,N*-acetalic purine, called bozepinib, the corresponding acyclic *O,N*-acetalic purine was obtained as a by-product. Due to the notable anti-proliferative properties of the latter we have carried out several structural modifications to give a new series of *p*-nitrobenzene- and dansyl-sulfonamides. The structures are potent anticancer compounds and the most potent compound shows an IC₅₀ of 134 nM against the A-375 cell line. Its dansyl fluorescent analogue is absorbed by the oral route of administration with systemic distribution. This drug accumulates mainly in the liver and kidney. Both compounds are nontoxic to BALB/c mice at the highest bolus dose of 250 mg/kg after 2 weeks. The fluorescence of the dansyl analogue of the most active compound has permitted us to conduct single-cell imaging of this drug upon binding to its targets in differentiated bulk tumour cells and cancer stem cells (CSC). These results encourage further studies in molecular CSC pathways and suggest that this molecule could be a new CSC-targeted drug.

We are looking forward to hearing from you very soon,

Sincerely yours

Prof. Joaquín Campos

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

p-Nitrobenzenesulfonamides and their Fluorescent Dansylsulfonamides derived from *N*-Alkylated *o*-(Purine-Methyl)Anilines as Novel Anti-Cancer Agents

Fátima Morales,^a Ana Conejo-García,^{a,b} Alberto Ramírez,^c Cynthia Morata,^{d,e} Juan Antonio Marchal,^{d,e,*} and Joaquín M. Campos^{a,b,*}

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

We have designed and synthesized a novel series of fourteen alkylated purines with notable *in vitro* anti-proliferative activities against three cancerous cell lines. *In vivo* studies show absorption by the oral route of administration with systemic distribution and low toxicity for the two more active derivatives (10 and 15).

Cancer is one of the most important health issues and the leading cause of death worldwide. Collaboration between researchers, epidemiologists and clinicians is essential to improve cancer control. Recent advances in the knowledge of cancer development have allowed researchers to determine that tumours are constituted by differentiated tumour cells and their precursor cells, also named as tumour-initiating cells or cancer stem cells (CSCs). These CSCs are a small tumour subpopulation responsible for initiating and maintaining tumour growth and are characterized by their self-renewal capacity and differentiation ability, the high metastatic potential and their quiescent state makes them resistant to chemo and radiotherapy.¹ Conventional anti-cancer therapies kill the rapidly proliferating bulk differentiated cancer cells but obviate the quiescent CSCs. Therefore, development of specific therapies targeted at CSCs holds hope to gain the fight against cancer.

We have previously described a series of cyclic and acyclic *O,N*-acetals (1 and 2, Figure 1) as potent anti-tumour compounds.²⁻⁵ The IC₅₀ values against the MCF-7 cell line were below 1 μM, 1 also called bozepinib, and 2 being the most potent structures so far reported (IC₅₀ = 0.355 μM in both cases). Moreover, they are the most selective compounds against the MCF-7 cell line [TIs (Therapeutic Index) = 5.14 and 5.25, respectively] in relation to the normal one.² cDNA microarray technology reveals potential drug targets, mainly centred on positive apoptosis regulatory pathway genes, and the repression of genes involved in carcinogenesis, proliferation, tumour invasion and CSCs related pathways.³ Bozepinib is a potent anti-tumour agent that induces apoptosis in breast and colon cancer cells mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR).⁴ The combination with IFNα potentiates the apoptosis induced by bozepinib and also enhances autophagy and senescence,⁴ both processes of great importance in tumour cells that show resistance to conventional chemotherapy. Bozepinib is

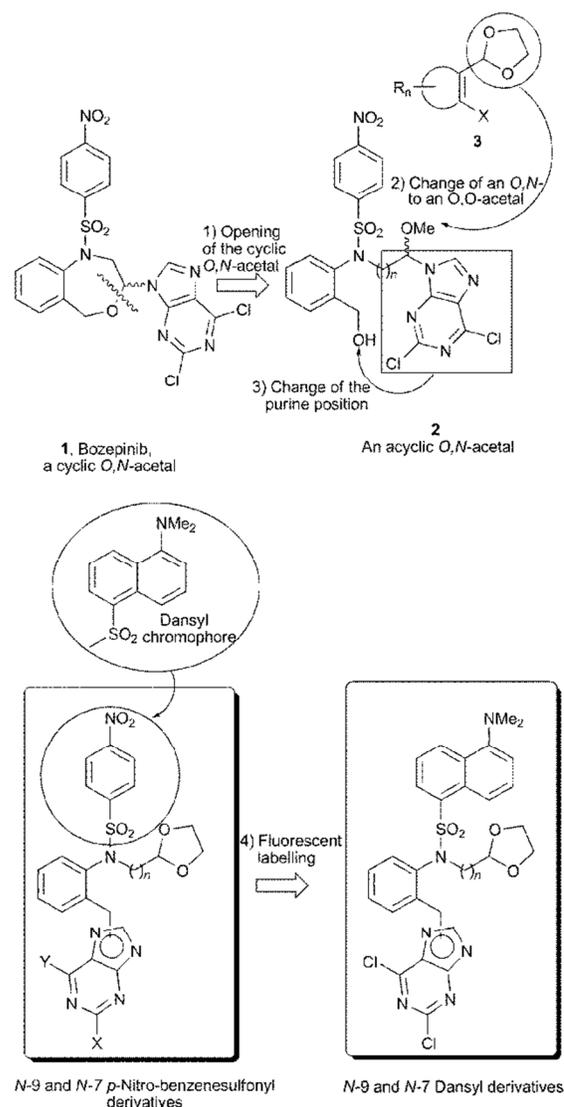


Figure 1

able to exert an inhibitory activity against the formation of both mammo- and colono-spheres and eliminates aldehyde dehydrogenase enriched (ALDH⁺) CSC subpopulations at a low micromolar range. Moreover, the inhibitory effect of bozepinib

on CSC pathways was emphasized by the down-regulation of c-Myc, β -CATENIN and SOX2 proteins and the up-regulation of the hedgehog-signalling repressor form of GLI-3. Bozepinib also shows *in vivo* anti-tumour and anti-metastatic efficacy in xenotransplanted nude mice without presenting sub-acute toxicity.⁵

In the present paper we present a new series of acyclic compounds with the aim to develop new anti-tumour agents based on the following modifications of the acyclic analogue of bozenipib (**2**), which in spite of being obtained as a by-product during the formation of bozepinib (**1**), its remarkable anti-proliferative properties² justify to be considered as a new prototype: in short, the change of position of the purine base to the benzylic carbon and concomitant replacement of the *O,N*-acetalic function for an *O,O*-acetalic one, in the form of the 1,3-dioxolane group (Figure 1). The anti-tumour activity has recently been described of a series of derivatives having a 1,3-dioxolane

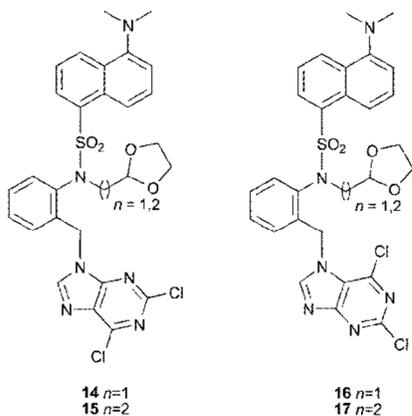
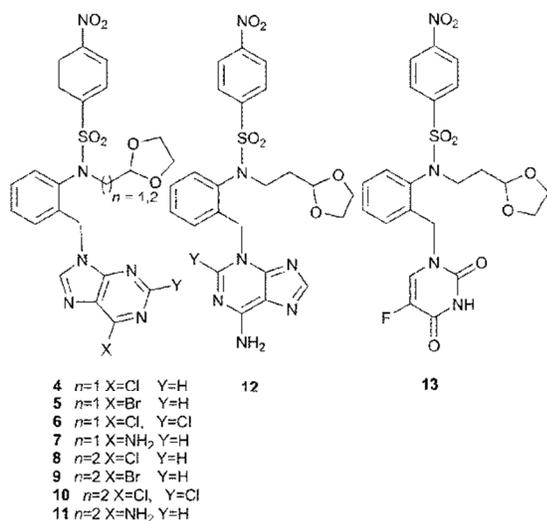


Figure 2

moiety in their structures (**3**). Such compounds are inhibitors of the proliferation and eradication of cancer cells, besides being inhibitors of CSCs.⁶ We maintain the *p*-nitrobenzenesulfonyl group and we introduce a linker between the sulfonamide and the dioxolane ($n=1,2$). We also include the 5-FU derivative (**13**) in order to act as a reference (Figure 2).

The target compounds **4-13** (Figure 1) are obtained following the synthetic procedure described in Scheme S1 ($R_1 = A$; $R_2 = C$, D, E and F). Compounds **18-20** were synthesised as previously

described.⁷ When **21** and **22** are treated with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in anhydrous THF to give the de-protected compounds **25** and **26**, by-products **29** and **30** are also obtained in smaller yields respectively (Scheme S2). Compounds **29** and **30** are the result of a Smiles rearrangement,⁸ in which the *p*-nitrophenyl group migrates to the hydroxyl group through the formation of the mono-nitro spiro-complex (Scheme S2).⁹ Target compounds **4-13** were obtained by microwave-assisted Mitsunobu reaction. Microwave-assisted organic synthesis is becoming instrumental for the rapid synthesis of drugs.¹⁰ The two following facts must be underlined: a) Reaction between **26** and adenine yields, apart from the *N*-9 derivative **11**, the *N*-3 derivative **12**,¹¹ and b) Reaction between **27** (and **28**) and 2,6-dichloropurine yields both the *N*-9 derivative **14** (and **15** when starting from **28**), and the *N*-7 derivative **16** (and **17** when starting from **28**).

The effects on cell proliferation were investigated on the human breast cancer cell line MCF-7, human colon carcinoma cell line HCT-116 and the human malignant melanoma cell line A-375. The anti-proliferative activities for **4-17** against the three tumour cell lines are shown in Table S1 in μ M units. The three most promising compounds are **8**, **9** and **10** (with IC₅₀ values ranging from 0.134 against A-375, and 4.110 against HCT-116 for **10**).

Fluorescence is a very useful technique to elucidate the mechanism of action of drugs inside the cell and to know their distribution in tissues and organs. Knowing drug distribution is critical for the design of more selective and efficient agents in cancer therapy, although this knowledge is neither always easy nor cheap. However, fluorescence technique provides a comprehensive tool for investigating these aspects in single cells and whole tissue.¹² Some drugs are inherently auto-fluorescent and therefore can be tracked using microscopy techniques, such as topotecan and camptothecin¹³ but others need to be labelled with chromophores such as the ones shown in Figure S1. As an example, the mechanism of action of the anti-tumour drug paclitaxel by the stabilization of the microtubules was disclosed by the fluorescence technique using fluorescein as a label in the drug.¹⁴ We have chosen the *p*-nitrobenzene sulfonyl derivative with $n=2$ and the 2,6-dichloropurine moiety (**10**), because it is the most active compound against the A-375 cell line, in order to study the *in vitro* and *in vivo* drug distribution by the fluorescence technique. Epidemiological studies showed that the incidence of melanoma is increasing at a rate faster than that of any other cancers worldwide.¹⁵ Therefore we need to design a fluorescent analogous of the target compound. The *p*-nitrobenzenesulfonyl group was interchanged with the dansyl group as a chromophore because of its similarity (**15**, Figure 2). Moreover, a fluorescence study of some anti-tumour drugs with a dansyl group in their structure that present no toxicity *in vivo*¹⁶ confirms the benefit of the use of this chromophore in the design. We also include the dansyl derivative with $n=1$ (**14**) in order to complete the SAR studies. For the synthesis, see Scheme S1, $R_1 = B$, and $R_2 = C$ and D. We can establish the following SARs for all the target compounds **4-17**: The IC₅₀ values of compounds with $n=2$ (**8-10**, **16**, **17**) are better than the corresponding of compounds with $n=1$ (**4-6**, **14**, **15**) and this fact might be attributed to the increase of lipophilicity.¹⁷ The most active compounds against all cell lines assayed are the 6-bromo, 6-chloro and 2,6-dichloropurine

derivatives (**1-6**, **8-12**, **14-17**, respectively), as has been previously reported.¹⁸ The *N*-3 adenine isomer (**12**) is slightly more active than the *N*-9 one (**11**). The 5-FU derivative (**13**) is the least active as anti-proliferative agent against all the cell lines.

It should be pointed out that all the target compounds show better anti-proliferative activity against the human melanoma cell line with sub-micromolar IC₅₀ values. Compound **10** is the best anti-proliferative agent of these *p*-nitrobenzenesulfonyl derivatives with an IC₅₀ of 134 nM against the A-375 cell line. Dansyl derivatives (**14-17**) are also potent anti-proliferative agents against all cell lines with IC₅₀ values between 0.3–3 μM, with the sole the exception of **14** against the MCF-7 cell line (IC₅₀ = 10.40 μM). Interestingly, when we tested the anti-proliferative activities for **8** and **10** on the A-375 isolated cell line, based on its ALDH activity, it was found that **10** shows a potent anti-proliferative activity against this isolated subpopulation (Table S2).

The effects on cell cycle distribution of the most active compounds (**4-6**, **8-10**, **14-17**) were analysed by flow cytometry for 24 and 48 h at 3 × IC₅₀ in the A-375 cell line (Table S3). Compounds **5** and **8-10** provoked a G₂/M cell cycle arrest at the expense of the other two phases (26.60%, 34.40%, 37.27% and 21.36%, respectively, in contrast to the 8.71% of the control). The induction of the G₂/M cell cycle arrest by three compounds previously synthesised by us was associated with increased phosphorylation of eIF2α in human breast cancer cells.¹⁹

The effects of the most active compounds (**4-6**, **8-10**, **14-17**) on apoptosis in the A-375 cell line were analysed by flow cytometry after 24 and 48 h of treatment, in order to study the mechanisms of their anti-tumour activity. The results are shown in Table S4. The most apoptotic compounds are **8-10**, that are also the most active as anti-proliferative agents.

Toxicity was determined after selecting the most active compound (**10**) that presents an IC₅₀ value of 0.134 μM against A-375 cells. Its fluorescent analogous **15** was included in this study. We examined the acute-toxicity profile of **10** and **15** in BALB/c mice when they were administered in a single oral bolus each one (*n* = 40) at doses levels of 50-250 mg/kg for a week. Compounds **10** and **15** were nontoxic, even at the highest bolus dose of 250 mg/kg after 2 weeks. All the 40 **10**-treated and **15**-treated mice remained healthy throughout the 14-day observation period with no evidence of morbidity.

Fluorescence lifetime imaging microscopy has been shown to be a useful tool in studying drug distribution in biological tissues.²⁰ We subsequently investigated the *in vitro* and *in vivo* distribution of **15**, which is the fluorescent analogous of **10**, in three tumour cell lines, in mice organs and tissues. MCF-7 breast cancer cells, HCT-116 colon cancer cells and A-375 melanoma cells were treated with compound **15** and absorbance was measured from 30 min to 2 h. Our results showed an increase in uptake quantities in treated cells that was time-dependent, being higher for MCF-7 at 30 min and 1 h. However, not significant differences were found after 2 hours of treatment with **15** for the three tumour cell lines (Figure 3A).

Clearly, it is important to directly monitor the means by which **15** penetrates the cell membrane and whether it penetrates cell nuclei. To study the entry and distribution of **15**, confocal imaging was used in the A-375 melanoma treated-cells. (Figure 3B, Movies S1 and S2).

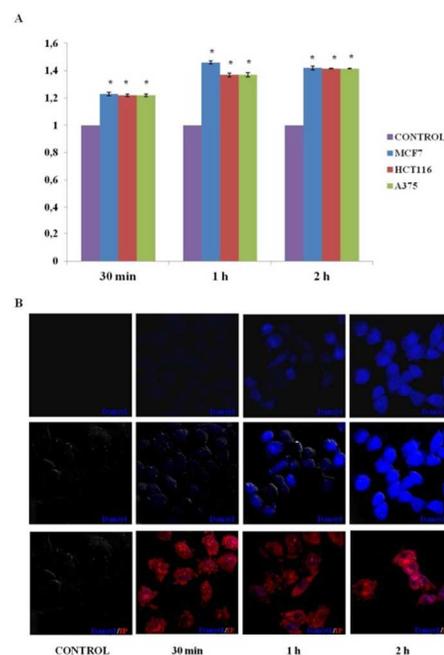


Figure 3. A. Uptake of **15** compound by MCF-7, HCT-116 and A-375 cancer cell lines after treatment for 30 min, 1 h and 2 h. B. Confocal microscopy of A-375 melanoma cells after treatment for 30 minutes, 1 h and 2 h with a concentration of 10 μM of **15**.

Images show that after 1 h, **15** was internalized in a high percentage of cells and it was distributed in the perinuclear zone. After 2 h most of the cells showed enhanced fluorescence intensity and in some of them, **15** was located inside the cell. After 4 h a significant fraction of **15** was identified inside the cell nuclei with additional portions surrounding the perinuclear region (Figure 4). Molecules observed in the cytoplasm appear as bright blue spots, suggesting that they were embedded by cells via endocytosis.

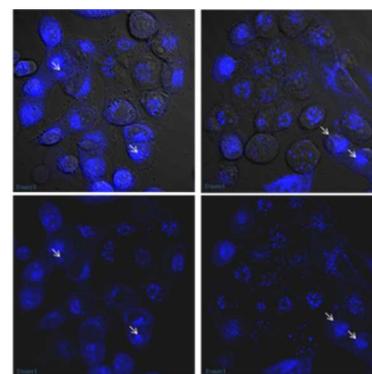


Figure 4. Dansyl distribution of **15** after 4 hours.

For *in vivo* organ distribution analysis, mice were treated with **10** and **15** (100 mg/kg) by oral administration and fluorescence was detected in the organs extracted by necropsy after 6 h (Figure 5A). Fluorescence intensity was high in all organs and tissues of mice treated with **15**, with the exception of pancreas and lungs (Figure 5B). Fluorescence intensity was not detected in mice treated with **10**, used as a control (Figure 5A). Results confirm that the drug is absorbed by the oral route of administration with systemic distribution. Furthermore the drug accumulates mainly

in liver and kidney, the organs associated to drug metabolism and excretion, respectively.

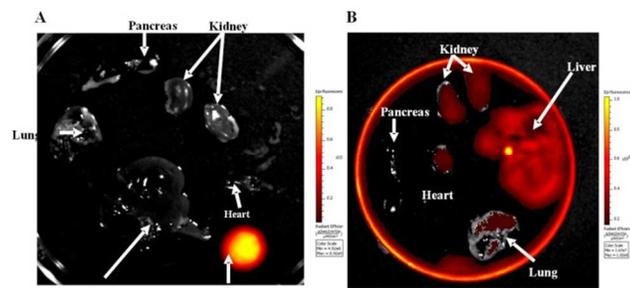


Figure 5. *In vivo* distribution study of **10** and **15** using the IVIS Spectrum imaging system. **A.** Distribution of **10** in several organs. A drop of **15** was used as positive control. **B.** Distribution of **15** in several organs.

Conclusions

A series of *p*-nitrobenzenesulfonyl and dansyl derivatives have been designed, synthesised and biologically evaluated as anti-tumour agents. Derivatives with a 6-bromo-, 6-chloro- and 2,6-dichloro-purine show better anti-proliferative activities against all the assayed cell lines than the adenine and 5-FU derivatives. Compounds with a dimethylene linker ($n=2$) are better anti-proliferative agents than those with a methylene linker ($n=1$). 2,6-Dichloropurine derivative with $n=2$ and the *p*-nitrobenzenesulfonyl moiety (**10**) is the most active compound as an anti-proliferative agent with an IC_{50} of 134 nM against the A-375 cell line. In the A-375 ALDH⁺CSC subpopulation **10** shows a high anti-proliferative activity. The most apoptotic compounds are the purine derivatives with $n=2$ and they provoked a G₂/M cell cycle arrest. Moreover, the 6-bromopurine derivative (**9**) is the most potent apoptosis inducer so far reported by us.

The fluorescence of *N*-9 2,6-dichloropurine derivative with $n=2$ (**15**) was detected by fluorimetric assays in cell cultures. Confocal imaging showed fluorescent *N*-9 dichloropurine derivative with $n=2$ distribution in cell. The fluorescent compound seems to be incorporated to cell by an endocytic process. We observed vesicle transportation through cell cytoplasm and these vesicles seems to accumulate in Golgi apparatus, near cell nucleus and at late time (4 h) inside nuclei. It has been demonstrated that **10** and its fluorescent analogous **15** are nontoxic to BALB/c mice, even at the highest bolus dose of 250 mg/kg after 2 weeks. Compound **15** is absorbed by the oral route of administration with systemic distribution. Furthermore the drug accumulates mainly in liver and kidney, the organs associated to drug metabolism and excretion respectively. Our findings support the potent anti-tumour ability of the fluorescent derivative (**15**) which has permitted to conduct single-cell imaging of this drug upon binding to its targets in differentiated bulk tumour cells and CSCs. These results encourage further studies in molecular CSC pathways and suggest that this molecule could be a new CSC-targeted drug.

We thank the Instituto de Salud Carlos III through projects no. PI10/00592 and PI10/02295 and the European Regional Development Fund for financial supports. The award of a grant from the Ministerio de Educación to Fátima Morales is gratefully acknowledged.

Notes and references

^aDepartment of Pharmaceutical and Organic Chemistry, c/ Campus de Cartuja, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18081 Granada, Spain. Fax: +34 958 24 38 45, Tel: +34 958 24 38 50. E-mail: jmcamos@ugr.es.

^bBiosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

^cDepartment of Health Sciences, Paraje de lasLagunillas s/n, University of Jaén, Jaén, Spain.

^{d,e}*Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Granada, Spain; Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA),18071 Granada, Spain. Fax: +34 958 24 62 96, Tel: +34958 24 93 21. E-mail: jmarchal@ugr.es.

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: See DOI: 10.1039/b000000x/

- V. Tirino, V. Desiderio, F. Paino, A. De Rosa, F. Papaccio, M. La Noce, L. Laino, F. De Francesco, G. Papaccio, *FASEB J*, 2013, **27**, 13.
- L. C. López-Cara, A. Conejo-García, J. A. Marchal, G. Macchione, O. Cruz-López, H. Boulaiz, M. A. García, F. Rodríguez-Serrano, A. Ramírez, C. Cativiela, A. I. Jiménez, J. M. García-Ruiz, D. Choquesillo-Lazarte, A. Aránega, J. M. Campos, *Eur J Med Chem*, 2011, **46**, 249.
- O. Caba, M. Díaz-Gavilán, F. Rodríguez-Serrano, H. Boulaiz, A. Aránega, M. A. Gallo, J. A. Marchal, J. M. Campos, *Eur J Med Chem*, 2011, **46**, 3802.
- J. A. Marchal, E. Carrasco, A. Ramírez, G. Jiménez, C. Olmedo, M. Perán, A. Agil, A. Conejo-García, O. Cruz-López, J. M. Campos, M. A. García, *Drug Des Devel Ther*, 2013, **7**, 1301.
- A. Ramírez, H. Boulaiz, C. Morata-Tarifa, M. Perán, G. Jiménez, M. Picón-Ruiz, A. Agil, O. Cruz-López, A. Conejo-García, J. M. Campos, A. Sánchez, M. A. García, J. A. Marchal, *Oncotarget*, 2014, **5**, 3590.
- M. Annette, S. Patil, N. S. Malik, K. D. Panghavane, *PCT Int Appl*, 2012, WO 2012081039 A1 20120621.
- M. Díaz-Gavilán, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Gómez-Vidal, J. A. Marchal, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 11547.
- K. Bowden, P. R. Williams, *J Chem Soc Perkin Trans*, 1991, **2**, 215.
- L. Fitzgerald, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Chem Lett*, 1984, 29.
- A. Conejo-García, M. C. Núñez, J. A. Marchal, F. Rodríguez-Serrano, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos. *Eur J Med Chem*, 2008, **43**, 1742.
- M. E. García-Rubiño, M. C. Núñez-Carretero, D. Choquesillo-Lazarte, J. M. García-Ruiz, Yolanda Madrid, J. M. Campos. *RSC Adv*, 2014, **4**, 22425.
- N.S. Whitea, R. J. Erringtonb, *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**, 17.
- H. M. Coley, W. B. Amos, P. R. Tewntyman, *Br J Cancer*, 1993, **67**, 1316.
- M. P. Lillo, O. Cañadas, R. E. Dale. *Biochemistry*, 2002, **41**, 12436.
- M. S. Goldberg, J. T. Doucette, H. W. Lim, J. Spencer, J. A. Carucci, D. S. Rigel. *J Am Acad Dermatol*, 2007, **57**, 60.
- C. H. Chui, Q. Wang, W. C. Chow, M. C. Yuen, K. L. Wong, W. M. Kwok, G. Y. Cheng, R. S. Wong, S. W. Tong, K. W. Chan, F. Y. Lau, P. B. Lai, K. H. Lam, E. Fabbri, X. M. Tao, R. Gambari, W. Y. Wong, *Chem Commun*, 2010, **46**, 3538.
- R. Sánchez-Martín, J. M. Campos, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. Bález-Coronel, A. Rodríguez-González, M. A. Gallo, J. C. Laca, A. Espinosa. *J Med Chem*, 2005, **48**, 3354.
- M. C. Núñez, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Marchal, O. Caba, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 183.
- A. Conejo-García, M. E. García-Rubiño, J. A. Marchal, M. C. Núñez, A. Ramírez, S. Cimino, M. A. García, A. Aránega, M. A. Gallo, J. M. Campos, *Eur J Med Chem*, 2011, **46**, 3795.
- C. A. Thorling, Y. Dancik, C. W. Hupple, G. Medley, X. Liu, A. V. Zvyagin, T. A. Robertson, F. J. Burczynski, M. S. Roberts, *J Biomed Opt*, 2011, **16**, 086013.

***p*-Nitrobenzenesulfonamides and their Fluorescent Dansylsulfonamides derived from *N*-Alkylated *o*-(Purine-Methyl)Anilines as Novel Anti-Cancer Agents**

Fátima Morales^a, Ana Conejo-García^{a,b}, Alberto Ramírez^c, Cynthia Morata^{d,e}, Juan Antonio Marchal^{d,e,*†} and Joaquín M. Campos^{a,b,*†}

^aDepartment of Pharmaceutical and Organic Chemistry, c/ Campus de Cartuja, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18081 Granada, Spain. Fax: +34 958 24 38 45, Tel: +34 958 24 38 50. E-mail: jmcampos@ugr.es.

^bBiosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

^cDepartment of Health Sciences, Paraje de las Lagunillas s/n, University of Jaén, Jaén, Spain.

^{d,e,*}Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Granada, Spain; Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), 18071 Granada, Spain. Fax: +34 958 24 62 96, Tel: +34958 24 93 21. E-mail: jmarchal@ugr.es.

[†]J. A. M. and J. M. C. contributed equally.

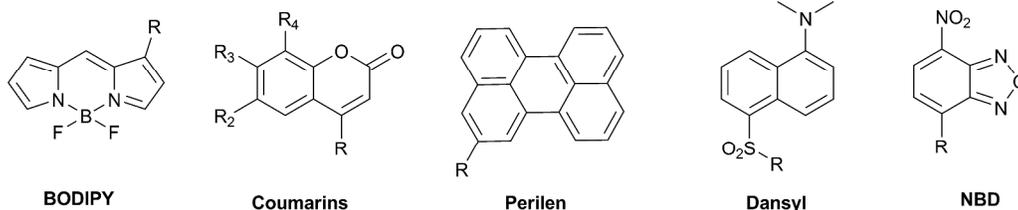
SUPPORTING INFORMATION

Table of Contents

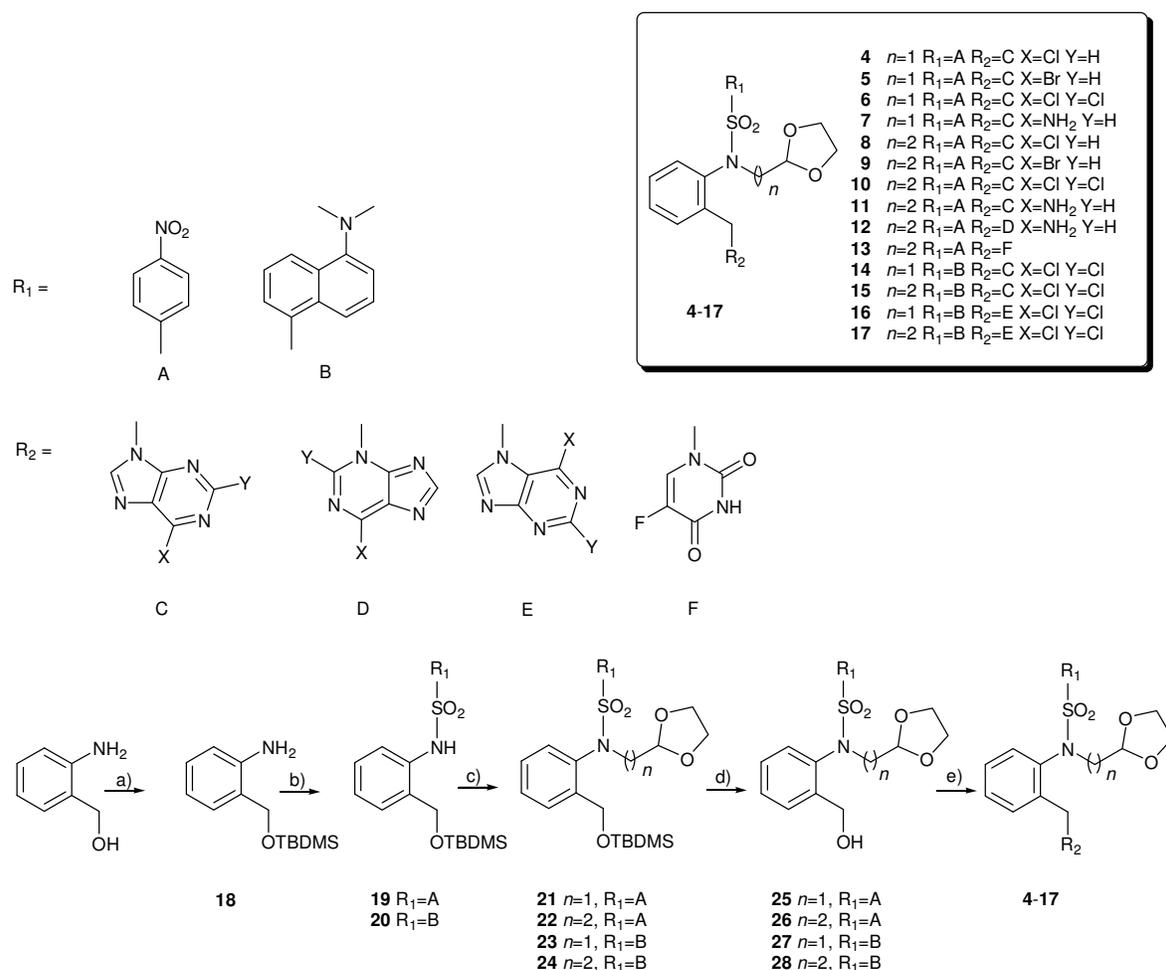
1. Figures and Schemes	S3
1.1. Figure S1	S3
1.2. Scheme S1	S3
1.3. Scheme S2	S4
2. Synthesis	S4
2.1. Materials and methods.....	S4
2.2. <i>N</i> -[2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-5-dansylsulfonamide (20)	S5
2.3. 2-(Hydroxymethyl)-1,3-dioxolane	S5
2.4. 2-(Hydroxyethyl)-1,3-dioxolane	S5
2.5. <i>N</i> -[2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]- <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>p</i> -nitrobenzene sulfonamide (21)	S6
2.6. <i>N</i> -[2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]- <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>p</i> -nitrobenzene sulfonamide (22).....	S6
2.7. <i>N</i> -[2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]- <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-5-dansylsulfonamide (23)	S7
2.8. <i>N</i> -[2-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]- <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-5-dansylsulfonamide (24)	S7
2.9. <i>N</i> -[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(2-hydroxymethylphenyl)- <i>p</i> -nitrobenzenesulfonamide (25) and <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-2-(<i>p</i> -nitrophenoxymethyl)aniline(29).....	S8
2.10. <i>N</i> -[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(2-hydroxymethylphenyl)- <i>p</i> -nitrobenzenesulfonamide (26) and <i>N</i> -[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-2-(4-nitrophenoxymethyl)aniline(30).....	S8
2.11. <i>N</i> -[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(2-hydroxymethylphenyl)-5-dansylsulfonamide (27)	S9
2.12. <i>N</i> -[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(2-hydroxymethylphenyl)-5-dansylsulfonamide (28)...S9	
2.13. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of 4-7	S10
2.13.1.6-Chloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenyl)sulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (4).....	S10

2.13.2.6-Bromo-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (5).....	S10
2.13.3.2,6-Dichloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (6).....	S10
2.13.4.9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -adenine (7)	S11
2.14. General procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of 8-13	S11
2.14.1.6-Chloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (8).....	S11
2.14.2.6-Bromo-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (9).....	S12
2.14.3.2,6-Dichloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine(10).....	S12
2.14.4.9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -adenine (11)	S12
2.14.5.3-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-3 <i>H</i> -adenine (12)	S13
2.14.6.1-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(<i>p</i> -nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-5-fluorouracil (13).....	S13
2.15. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of 14-17	S13
2.15.1.2,6-Dichloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (14).....	S14
2.15.2.2,6-Dichloro-7-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]- <i>N</i> -(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-7 <i>H</i> -purine (16).....	S14
2.15.3.2,6-Dichloro-9-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-9 <i>H</i> -purine (15).....	S14
2.15.4.2,6-Dichloro-7-(2-{ <i>N</i> -[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]- <i>N</i> -(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-7 <i>H</i> -purine (17).....	S15
3. Biological assays	S16
3.1. Tables	S16
3.1.1. Table S1	S16
3.1.2. Table S2	S16
3.1.3. Table S3	S17
3.1.4. Table S4	S18
3.2. Cell culture	S18
3.2.1. Aldehyde dehydrogenase assay and separation of the ALDH-positive cell subpopulation by FACS	S18
3.3. Drug treatment.....	S19
3.4. Proliferation assays.....	S19
3.4.1. MTS cell viability assay	S19
3.5. Cell cycle distribution analysis.....	S20
3.6. Apoptosis detection by staining with Annexin V-FITC and propidium iodide.....	S20
3.7. Fluorescence detection and confocal imaging	S20
3.8. <i>In vivo</i> acute toxicity	S20
3.9. <i>In vivo</i> distribution assay	S21
3.10. Statistical analyses.....	S21
4. References	S21

1. Figures and Schemes

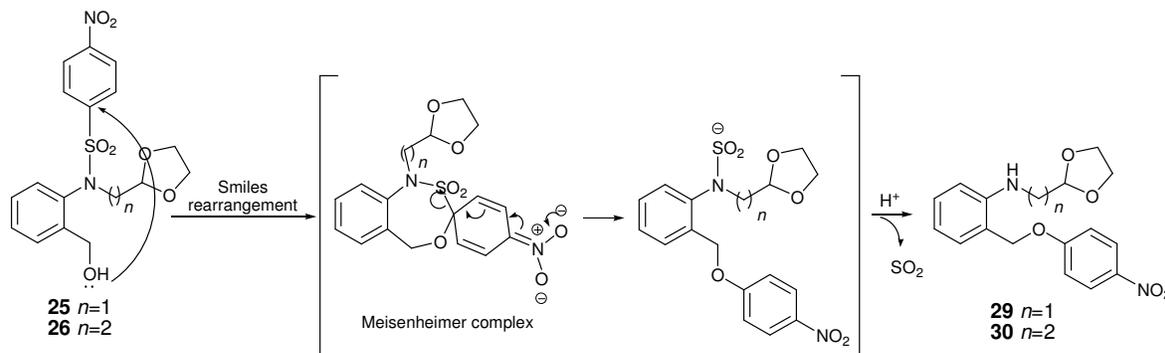


1.1. Figure S1. Some chromophores commonly used as labels for drug delivery with fluorescence techniques.



1.2. Scheme S1. Reagents and conditions: a) TBDMS-Cl, DMAP, Et_3N , anhydrous CH_2Cl_2 , rt, 6h (100%). b) *p*-NO₂-Ph-SO₂Cl, anhydrous CH_2Cl_2 , rt, 3h (100% for **19**); Ds-Cl, Et_3N , anhydrous CH_2Cl_2 , 30 °C, 24h (100% for **20**). c) 2-Hydroxymethyl-1,3-dioxolane (for **21** and **23**) or 2-(2-hydroxyethyl)-1,3-dioxolane (for **22** and **24**), DIAD, PPh_3 , anhydrous THF, 30 °C, 21h (84% for **21**, 71% for **22**, 68%, for **23** and 91% for **24**). d) TBAF, anhydrous THF, rt, 3h (48% for **25**, 78% for **26**, 100% for **27** and **28**). e) DIAD (1.1 eq for **8**, 2.2 eq for **4-7**, **9-17**), PPh_3 (1.1 eq for **8**, 2.2 eq for **4-7**, **9-17**), anhydrous THF, 140 °C (for **4-9,11-**

13) or 160 °C (for **10**, **14-17**), MW, 25 min (for **4-9,11-17**) or 1 h (for **10**) (53% for **4**, 44% for **5**, 53% for **6**, 18% for **7**, 14% for **8**, 32% for **9**, 32% for **10**, 48% for **11**, 25% for **12**, 17% for **13**, 62% for **14**, 13% for **16**, 75% for **15**, and 7% for **17**).



1.3. Scheme S2. Proposed mechanism for the formation of by-products **29** and **30**.

2. Synthesis

Compounds **18**¹ and **19**² have been previously reported. Synthetic procedures have not been described for **4-17**, **20-18**, **29** and **30**. We herein therefore report the synthetic procedure and characterization data for the compounds that were employed.

2.1. Materials and methods

Melting points were taken in open capillaries on an Electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. Analytical thin layer chromatography was performed using Merck Kieselgel 60 F254 aluminum sheets, the spots being developed with UV light ($\lambda = 254$ nm). All evaporation was carried out *in vacuo* with a Büchi rotary evaporator and the pressure controlled by a Vacuubrand CVCII apparatus. For flash chromatography, Merck silica gel 60 with a particle size of 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) was used. Nuclear magnetic resonance spectra have been carried out at the Centro de Instrumentación Científica (CIC)/Universidad de Granada, and recorded on a 300 MHz ^1H and 75 MHz ^{13}C NMR Varian Inova-TM spectrometers at room temperature. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak. Signals are designated as follows: s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; ddd, double double doublet; pst, pseudotriplet; t, triplet; m, multiplet. High-resolution Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization (NALDI-TOF) or Electrospray Ionization (ESITOF) mass spectra were carried out on a Bruker Autoflex or a Waters LCT Premier Mass Spectrometer, respectively. Anhydrous CH_2Cl_2 was purchased from VWR International Eurolab. Anhydrous conditions were performed under argon. All remaining reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. *N*-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-5-dansylsulfonamide (**20**)

Dansyl chloride (3.42 g, 12.67 mmol) and Et₃N (1.76 g, 17.28 mmol) was added dropwise to a solution of **18** (2.74 g, 11.52 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (35 mL). The reaction mixture was heated for 24 h at 30 °C, washed (H₂O), and dried (Na₂SO₄). The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (0.5:10 → 1:10) as eluent to obtain **20** as a yellowish syrup (4.04 g, 100%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.66 (s, 1H, NH), 8.49 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.7, 1H), 8.22 (dd, *J* = 7.3, *J* = 1.2), 7.53 (dd, *J* = 8.7, *J* = 7.7, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.18 – 7.14 (m, 2H), 6.93 (ddd, *J* = 7.5, *J* = 7.4, *J* = 1.1, 1H), 6.88 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.4, 1H), 4.30 (s, 2H), 2.86 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 0.06 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 152.03, 137.26, 135.57, 130.68, 130.38, 129.97, 129.95, 129.74, 128.78, 128.36, 128.00, 124.22, 123.26, 121.46, 118.95, 115.31, 65.40, 45.56, 25.94, 18.33, -5.26. HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ calcd. for C₂₅H₃₅N₂O₃SSi 471.2059; found 471.2138. Anal. calcd. for C₂₅H₃₄N₂O₃SSi: C 63.79; H 7.28, N 5.95; found: C 63.76, H 7.22, N 5.92.

2.3. 2-(Hydroxymethyl)-1,3-dioxolane

A solution of 27% NaOH (22 mL) was added to a solution of Na₂CO₃·10H₂O (23.46 g, 0.082 mol) in H₂O (60 mL). 2-(2-Bromomethyl)-1,3-dioxolane (16.70 g, 0.100 mol) was added dropwise afterwards. The reaction mixture was heated for 6 h at 160 °C in a sealed tube, filtered, extracted (CH₂Cl₂) and dried (Na₂SO₄). The solvent was evaporated and the residue was purified by distillation in a Kugelrohr apparatus as a colourless syrup (2.43 g, 24%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.06 (t, *J* = 4.0, 1H), 3.93 (m, 4H), 3.62 (d, *J* = 4.0, 2H). HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ calcd. for C₄H₉O₃ 105.0473; found 105.0493.

2.4. 2-(Hydroxyethyl)-1,3-dioxolane

A solution of 27% NaOH (22 mL) was added to a solution of Na₂CO₃·10H₂O (23.46 g, 0.082 mol) in H₂O (60 mL). 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolane (18.10 g, 0.100 mol) was added dropwise afterwards. The reaction mixture was heated for 6 h at 160 °C in a sealed tube, filtered, extracted (CH₂Cl₂) and dried (Na₂SO₄). The solvent was evaporated and the residue was purified by distillation in a Kugelrohr apparatus as a colourless syrup (4.18 g, 36%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.02 (t, *J* = 4.23, 1H), 3.98 (m, 4H), 3.78 (m, 2H), 2.32 (s, 1H), 1.96 (m, 2H). HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ calcd. for C₅H₁₀O₃ 118.0630; found 118.0642.

2.5. *N*-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*p*-nitrobenzenesulfonamide (21**)**

A solution of **19** (2.00 g, 4.73 mmol), 2-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolane (492.4 mg, 4.73 mmol) and PPh₃ (1.49 g, 5.68 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was cooled at - 20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (1.05 g, 5.20 mmol) was added dropwise at - 20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The reaction mixture was heated for 21 h at 30 °C. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:8) as eluent to yield **21** as a yellowish syrup (2.03 g, 84%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.33 (d, *J*₁=*J*₂= 9.0, 2H), 7.85 (d, *J*₁=*J*₂= 9.0, 2H), 7.69 (dd, *J*₁= 7.7, *J*₂= 1.1, 1H), 7.39 (ddd, *J*₁= 7.7, *J*₂= 7.4, *J*₃=1.1, 1H), 7.11 (ddd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 7.4, *J*₃=1.1, 1H), 6.47 (dd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 1.1, 1H), 5.02 (d, *J*_{gem}= 14.4, 1H), 4.96 (pst, *J*= 4.7, 1H), 4.94 (d, *J*_{gem}= 14.4, 1H), 3.91 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}=5.1, 1H), 3.89 – 3.77 (m, 4H), 3.48 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}=5.1, 1H), 0.97 (s, 9H), 0.12 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 150.32, 144.27, 143.35, 135.88, 129.55, 129.40, 128.46, 127.57, 127.37, 124.05, 101.70, 65.14, 61.21, 54.76, 26.06, 18.71, -5.06. HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ calcd. for C₂₃H₃₂N₂O₇SSiNa 531.1699; found 531.1585. Anal. calcd. C₂₃H₃₂N₂O₇SSi: C 54.31, H 6.34, N 5.51; found: C 54.38; H 6.32, N 5.53.

2.6. *N*-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*p*-nitrobenzenesulfonamide (22**)**

A solution of **19** (2.00 g, 4.73 mmol), 2-(hydroxyethyl)-1,3-dioxolane (559.1 mg, 4.73 mmol) and PPh₃ (1.49 g, 5.68 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was cooled at - 20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (1.05 g, 5.20 mmol) was added dropwise at - 20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The reaction mixture was heated for 21 h at 30 °C. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:7) as eluent to yield **22** as a white solid (1.75 g, 71%). Mp: 107-108 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (d, *J*₂₋₃=*J*₅₋₆= 8.6, 2H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂= 8.6, 2H), 7.66 (d, *J*= 7.5, 1H), 7.35 (pst, *J*₁= *J*₂= 7.5, 1H), 7.10 (pst, *J*₁= *J*₂= 7.5, 1H), 6.43 (d, *J*= 7.5, 1H), 4.94 (d, *J*_{gem}= 14.3, 1H), 4.87 (d, *J*_{gem}= 14.3, 1H), 4.80 (pst, *J*= 4.4, 1H), 4.03 – 3.92 (m, 1H), 3.92 – 3.75 (m, 4H), 3.43 – 3.30 (m, 1H), 2.03 – 1.89 (m, 1H), 1.80 – 1.65 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.02 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 150.41, 144.08, 143.43, 135.38, 129.51, 129.38, 128.77, 127.64, 126.93, 124.31, 102.11, 65.18, 61.37, 47.66, 32.77, 26.20, 18.62, -5.07. HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ calcd. for C₂₄H₃₄N₂O₇SSiNa 545.1856; found 545.1752. Anal. calcd. C₂₄H₃₄N₂O₇SSi: C 55.15, H 6.56, N 5.36; found: C 55.20; H 6.58, N 5.39.

2.7. *N*-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-5-dansylsulfonamide (23)

A solution of **20** (2.00 g, 4.67 mmol), 2-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolane (486.2 mg, 4.67 mmol) and PPh₃ (1.47 g, 5.60 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was cooled at - 20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (1.04 g, 5.14 mmol) was added dropwise at - 20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The reaction mixture was heated for 21 h at 30 °C. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:9) as eluent to yield **23** as a yellowish syrup (1.76 g, 68%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.54 (d, *J*= 8.4, 1H), 8.15 (d, *J*= 8.7, 1H), 8.02 (dd, *J*₁= 7.5, *J*₂= 1.1), 7.56 (d, *J*= 7.7, 1H), 7.42 (dd, *J*₁= 8.4, *J*₂= 7.5, 1H), 7.36 (dd, *J*₁= 8.7, *J*₂= 7.6, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 1H), 7.14 (d, *J*= 7.6, 1H), 6.95 (ddd, *J*₁= 7.9, *J*₂= 7.5, *J*₃= 1.2, 1H), 6.64 (d, *J*= 7.9, 1H), 5.02 (pst, *J*= 4.8, 1H), 4.85 (d, *J*_{gem}= 14.4, 1H), 4.57 (d, *J*_{gem}= 14.4, 1H), 3.95 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}= 4.9, 1H), 3.93 – 3.70 (m, 4H), 3.51 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}= 4.6, 1H), 2.88 (s, 6H), 0.92 (s, 9H), 0.02 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 151.47, 143.00, 136.22, 134.41, 131.14, 130.67, 130.55, 129.98, 129.51, 128.63, 127.88, 127.64, 126.93, 123.21, 120.46, 115.32, 102.20, 64.98, 61.10, 54.58, 45.54, 26.08, 18.43, - 5.31. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₉H₄₁N₂O₅SSi 557.2427; found 557.2514. Anal. calcd. C₂₉H₄₀N₂O₅SSi: C 62.56, H 7.24, N 5.03; found: C 62.60, H 7.28, N 5.08.

2.8. *N*-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl]-*N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-5-dansylsulfonamide (24)

A solution of **20** (2.00 g, 4.67 mmol), 2-(hydroxyethyl)-1,3-dioxolane (551.7 mg, 4.67 mmol) and PPh₃ (1.47 g, 5.60 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was cooled at - 20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (1.04 g, 5.14 mmol) was added dropwise at - 20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The reaction mixture was heated for 21 h at 30 °C. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:9) as eluent to yield **24** as a yellowish syrup (2.43 g, 91%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.54 (d, *J*= 8.5, 1H), 8.17 (d, *J*= 8.7, 1H), 8.05 (dd, *J*₁= 7.5, *J*₂= 1.2, 1H), 7.56 (d, *J*= 7.4, 1H), 7.44 (dd, *J*₁= 8.5, *J*₂= 7.5, 1H), 7.38 (dd, *J*₁= 8.7, *J*₂= 7.5, 1H), 7.29 (ddd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 7.4, *J*₃= 1.1, 1H), 7.14 (d, *J*= 7.5, 1H), 7.00 (ddd, *J*₁= 8.0, *J*₂= 7.6, *J*₃= 1.5, 1H), 6.67 (dd, *J*₁= 8.0, *J*₂= 0.8, 1H), 4.81 (pst, *J*= 4.6, 1H), 4.71 (d, *J*_{gem}= 14.1, 1H), 4.58 (d, *J*_{gem}= 14.1, 1H), 3.95 – 3.88 (m, 1H), 3.89 – 3.71 (m, 4H), 3.64 – 3.53 (m, 1H), 2.88 (s, 6H), 1.95 – 1.86 (m, 1H), 1.81 – 1.73 (m, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.02 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 151.60, 142.90, 135.53, 134.66, 131.13, 130.60, 130.52, 130.06, 129.49, 128.66, 128.07, 127.88, 127.15, 123.30, 120.50, 115.34, 102.34, 65.01, 61.22, 47.20, 45.59, 33.01, 26.10, 16.46, -5.26. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₃₀H₄₃N₂O₅SSi 571.2584; found 571.2662. Anal. calcd. C₃₀H₄₂N₂O₅SSi: C 63.12, H 7.42, N 4.91; found: C 63.18, H 7.48, N 5.01.

2.9. *N*-[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(2-hydroxymethylphenyl)-*p*-nitrobenzenesulfonamide (**25**) and *N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-2-(*p*-nitrophenoxymethyl)aniline (**29**)

TBAF (1.07 g, 3.40 mmol) was added to a solution of **21** (1.73 g, 3.40 mmol) in anhydrous THF (20 mL) and stirred for 3 h at rt under argon atmosphere. The reaction mixture was evaporated, washed (H₂O), dried (Na₂SO₄) and purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:3 →1:1) as eluent gradient to allow the separation of **25** and **29**.

25: White solid (643.0 mg, 48%). Mp: 135-136 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (d, *J*₁=*J*₂= 9.0, 2H), 7.83 (d, *J*₁=*J*₂= 9.0, 2H), 7.64 (dd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 1.5, 1H), 7.40 (ddd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 7.5, *J*₃=1.2, 1H), 7.17 (ddd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 7.5, *J*₃=1.5, 1H), 6.40 (dd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 1.2, 1H), 5.07 (dd, *J*= 5.6, 4.1, 1H), 4.93 (d, *J*_{gem}= 12.5, 1H), 4.75 (d, *J*_{gem}= 12.5, 1H), 3.98 (dd, *J*_{gem}= 14.0, *J*_{vic}= 4.1, 1H), 3.95 – 3.80 (m, 4H), 3.32 (dd, *J*_{gem}= 14.0, *J*_{vic}= 5.7, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 150.50, 143.36, 142.81, 137.50, 131.99, 129.90, 129.58, 128.86, 127.26, 124.27, 102.06, 65.18, 61.30, 55.17. HRMS (m/z): [M + Na]⁺ calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₇SNa 417.0835; found 417.0733. Anal. calcd. C₁₇H₁₈N₂O₇S: C 51.77, H 4.60, N 7.10; found: C 51.80; H 4.65, N 7.06.

29: White solid (240.3 mg, 22%). Mp: 125-126 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.21 (d, *J*₁=*J*₂= 9.3, 2H), 7.28 (ddd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 7.6, *J*₃=1.6, 1H), 7.21 (dd, *J*₁= 7.7, *J*₂= 1.6, 1H), 7.08 (d, *J*₁=*J*₂= 9.3, 2H), 6.80 – 6.72 (m, 2H), 5.15 – 5.11 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 3.97 – 3.86 (m, 4H), 3.39 (d, *J*= 3.8, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.44, 147.45, 142.02, 130.68, 130.41, 126.02, 119.83, 117.56, 115.23, 111.65, 102.41, 70.46, 65.44, 46.44. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₁₇H₁₉N₂O₅ 331.1216; found 331.1293. Anal. calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₅: C 61.81; H 5.49, N 8.48; found: C 61.98, H 5.27, N 8.52.

2.10. *N*-[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(2-hydroxymethylphenyl)-*p*-nitrobenzenesulfonamide (**26**) and *N*-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-2-(*p*-nitrophenoxymethyl)aniline (**30**)

TBAF (371.7 mg, 1.18 mmol) was added to a solution of **22** (615.7 mg, 1.18 mmol) in anhydrous THF (20 mL) and stirred for 3 h at rt under argon atmosphere. The reaction mixture was evaporated, washed (H₂O), dried (Na₂SO₄) and purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:3 →1:1) as eluent gradient to allow the separation of compounds **26** and **30**.

26: White solid (303.8 mg, 78%). Mp: 63-64 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.67 (d, *J*= 7.7, 1H), 7.41 (pst, *J*₁= *J*₂= 7.7, 1H), 7.18 (pst, *J*₁= *J*₂= 7.7, 1H), 6.41 (d, *J*= 7.7, 1H), 4.84 (d, *J*_{gem}= 12.6, 1H), 4.80 (pst, *J*= 4.2, 1H), 4.63 (dd, *J*_{gem}= 12.6, *J*_{vic}= 7.4, 1H), 4.05 – 3.96 (m, 1H), 3.91 – 3.71 (m, 4H), 3.35 – 3.23 (m, 1H), 1.96 – 1.83 (m, 1H), 1.72 – 1.60 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 150.28, 143.28, 142.78, 136.38, 131.73, 129.75, 129.50, 128.87, 126.75, 124.32, 102.02, 65.16, 61.08, 47.63, 32.42. HRMS (m/z): [M - H]⁻ calcd. for C₁₈H₁₉N₂O₇S 407.0991; found 407.0922. Anal. calcd. C₁₈H₂₀N₂O₇S: C 52.93, H 4.94, N 6.86; found: C 52.80; H 4.90, N 6.88.

30: Yellowish solid (60.9 mg, 15%). Mp: 106-107 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (d, *J*₁=*J*₂= 9.2, 2H), 7.30 (ddd, *J*₁= 7.9, *J*₂= 7.6, *J*₃=1.3, 1H), 7.21 (dd, *J*₁= 7.3, *J*₂= 1.3, 1H),

7.08 (d, $J_1=J_2=9.2$, 2H), 6.75 – 6.72 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.97 (s, 1H), 4.95 (t, $J=4.4$, 1H), 3.91 – 3.63 (m, 4H), 3.31 (t, $J=6.2$, 2H), 2.07 – 1.99 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 163.84, 147.65, 141.87, 130.76, 130.51, 125.99, 119.35, 116.89, 115.09, 111.05, 104.14, 70.15, 64.96, 39.09, 33.00. HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ 345.1372; found 345.1444. Anal. calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$: C 62.78; H 5.85, N 8.13; found: C 63.00, H 5.78, N 8.39.

2.11. *N*-[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(2-hydroxymethylphenyl)-5-dansylsulfonamide (**27**)

TBAF (949.7 mg, 3.01 mmol) was added to a solution of **23** (1.67 g, 3.01 mmol) in anhydrous THF (18 mL) and stirred for 3 h at rt under argon atmosphere. The reaction mixture was evaporated, washed (H_2O), dried (Na_2SO_4) and purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:3 \rightarrow 1:1) as eluent gradient to obtain **27** as a yellowish solid (1.33 g, 100%). Mp: 58-59 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.57 (d, $J=8.4$, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.57 (dd, $J_1=7.7$, $J_2=1.5$, 1H), 7.45 (dd, $J_1=8.4$, $J_2=7.5$, 1H), 7.32 (dd, $J_1=8.6$, $J_2=7.6$, 1H), 7.29 (ddd, $J_1=7.7$, $J_2=7.5$, $J_3=0.8$, 1H), 7.14 (d, $J=7.6$, 1H), 6.92 (ddd, $J_1=8.0$, $J_2=7.5$, $J_3=1.7$, 1H), 6.31 (dd, $J_1=8.0$, $J_2=0.8$, 1H), 5.11 (pst, $J=4.8$, 1H), 4.92 (dd, $J_{\text{gem}}=12.4$, $J_{\text{vic}}=5.2$, 1H), 4.70 (dd, $J_{\text{gem}}=12.4$, $J_{\text{vic}}=5.3$, 1H), 4.15 (dd, $J_{\text{gem}}=14.1$, $J_{\text{vic}}=4.3$, 1H), 3.94 – 3.76 (m, 4H), 3.25 (dd, $J_{\text{gem}}=14.1$, $J_{\text{vic}}=5.5$, 1H), 2.88 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 151.59, 142.86, 138.03, 133.64, 131.42, 131.39, 130.99, 130.61, 130.05, 129.17, 128.80, 128.36, 128.00, 123.22, 120.34, 115.40, 102.54, 65.03, 61.53, 55.07, 45.57. HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 443.1562; found 443.1637. Anal. calcd. $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C 62.42, H 5.92, N 6.33; found: C 62.54, H 5.98, N 6.36.

2.12. *N*-[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(2-hydroxymethylphenyl)-5-dansylsulfonamide (**28**)

TBAF (1.33 g, 4.20 mmol) was added to a solution of **24** (2.40 g, 4.20 mmol) in anhydrous THF (25 mL) and stirred for 3 h at rt under argon atmosphere. The reaction mixture was evaporated, washed with H_2O , dried (Na_2SO_4) and purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:3 \rightarrow 1:1) as eluent gradient to obtain **28** as a yellowish solid (1.58 g, 100%). Mp: 64-65 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.56 (d, $J=8.4$, 1H), 8.08 (d, $J=8.7$, 1H), 8.05 (dd, $J_1=7.5$, $J_2=1.1$, 1H), 7.60 (dd, $J_1=7.6$, $J_2=1.5$, 1H), 7.46 (dd, $J_1=8.4$, $J_2=7.5$, 1H), 7.34 (dd, $J_1=8.7$, $J_2=7.6$, 1H), 7.30 (ddd, $J_1=7.6$, $J_2=7.5$, $J_3=0.8$, 1H), 7.14 (d, $J=7.6$, 1H), 6.95 (ddd, $J_1=7.9$, $J_2=7.5$, $J_3=1.5$, 1H), 6.37 (dd, $J_1=7.9$, $J_2=0.8$, 1H), 4.89 (d, $J_{\text{gem}}=12.3$, 1H), 4.82 (pst, $J=4.4$, 1H), 4.62 – 4.53 (m, 1H), 4.14 – 4.02 (m, 1H), 3.93 – 3.73 (m, 4H), 3.45 – 3.36 (m, 1H), 2.89 (s, 6H), 1.95 – 1.85 (m, 1H), 1.73 – 1.62 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 151.63, 142.62, 136.69, 133.87, 131.29, 131.27, 130.85, 130.52, 130.06, 129.11, 128.82, 128.36, 127.94, 123.27, 120.33, 115.37, 102.26, 65.05, 61.22, 47.44, 45.57, 32.75. HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 457.1719; found 457.1797. Anal. calcd. $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C 63.14, H 6.18, N 6.14; found: C 63.18, H 6.20, N 6.19.

2.13. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of 4-7

A solution of **25** (1 mmol), PPh₃ (2.2 mmol) and the corresponding purine derivative of 5-FU (1 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was cooled at -20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (2.2 equiv.) was added dropwise at -20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The microwave vial was sealed and irradiated at 140 °C for 25 min. After completion of irradiation time and cooling to room temperature through rapid pressurized air supply gas-jet, the solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:1) as eluent.

2.13.1. 6-Chloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (**4**)

White solid (71.6 mg, 53%). Mp: 220-221 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.80 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.35 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.29 – 7.25 (m, 1H), 7.21 – 7.17 (m, 1H), 7.05 (d, *J*= 7.3, 1H), 6.49 (d, *J*= 7.3, 1H), 5.92 (d, *J*_{gem}= 16.2, 1H), 5.85 (d, *J*_{gem}= 16.2, 1H), 5.18 – 5.15 (m, 1H), 4.16 – 4.04 (m, 1H), 4.01 – 3.82 (m, 4H), 3.30 (dd, *J*_{gem}= 13.9, *J*_{vic}= 5.6, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 152.69, 152.35, 151.23, 150.64, 146.49, 142.77, 137.98, 137.64, 131.47, 129.92, 129.56, 129.30, 129.14, 127.31, 124.41, 101.88, 65.33, 54.92, 43.41. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₂H₂₀ClN₆O₆S 531.0775; found 531.0845. Anal. calcd. C₂₂H₁₉ClN₆O₆S: C 49.77, H 3.61, N 15.83; found: C 49.81, H 3.65, N 15.85.

2.13.2. 6-Bromo-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (**5**)

Yellowish solid (46.7 mg, 44%). Mp: 197-198 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.75 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.35 (d, *J*₁=*J*₂= 8.7, 2H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂=8.7, 2H), 7.28 – 7.25 (m, 1H), 7.20 – 7.17 (m, 1H), 7.05 (d, *J*= 7.7, 1H), 6.45 (d, *J*= 7.7, 1H), 5.92 (d, *J*_{gem}= 16.1, 1H), 5.84 (d, *J*_{gem}= 16.1), 5.16 (dd, *J*= 5.6, 4.3, 1H), 4.09 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}= 4.0, 1H), 4.00 – 3.83 (m, 4H), 3.30 (dd, *J*_{gem}= 14.1, *J*_{vic}= 5.6, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 152.34, 151.48, 150.41, 146.37, 153.37, 142.77, 138.00, 137.66, 134.09, 129.95, 129.58, 129.33, 129.19, 127.30, 124.43, 101.96, 65.25, 55.16, 43.59. HRMS (m/z): [M + Na]⁺ calcd. for C₂₂H₁₉BrN₆O₆SNa 597.0270; found 597.0159. Anal. calcd. C₂₂H₁₉BrN₆O₆S: C 45.92, H 3.33, N 14.61; found: C 45.98, H 3.38, N 14.69.

2.13.3. 2,6-Dichloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine(**6**)

Yellowish solid (91.5 mg, 53%). Mp: 212-213 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (d, *J*₁=*J*₂= 8.9, 2H), 8.34 (s, 1H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂= 8.9, 2H), 7.30 (ddd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 7.6, *J*₃=1.3, 1H), 7.20 (ddd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 7.6, *J*₃=1.4, 1H), 6.80 (dd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 1.4, 1H), 6.47 (dd, *J*₁= 7.6, *J*₂= 1.3, 1H), 5.90 (d, *J*_{gem}= 16.2, 1H), 5.80 (d,

J_{gem} = 16.2, 1H), 5.15 (dd, J = 6.0, 4.1, 1H), 4.09 (dd, J_{gem} = 13.8, J_{vic} = 4.4, 1H), 4.00 – 3.86 (m, 4H), 3.28 (dd, J_{gem} = 13.8, J_{vic} = 5.6, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153.97, 153.36, 151.99, 150.68, 147.21, 142.71, 137.71, 137.56, 130.67, 130.01, 129.56, 129.49, 129.10, 127.32, 124.46, 101.85, 65.28, 55.19, 43.75. HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{SNa}$ 587.0386; found 587.0276. Anal. calcd. $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$: C 46.74, H 3.21, N 14.86; found: C 46.81, H 3.25, N 14.92.

2.13.4. 9-(2-{*N*-[(1,3-Dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-adenine (7)

Yellowish solid (28.5 mg, 18%). Mp: 227-228 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (s, 1H), 8.37 (d, $J_1=J_2$ = 8.8, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.86 (d, $J_1=J_2$ = 8.8, 2H), 7.28 – 7.25 (m, 1H), 7.17 – 7.14 (m, 1H), 7.07 (d, J = 7.9, 1H), 6.44 (d, J = 7.9, 1H), 5.98 (s, 2H), 5.82 (d, J_{gem} = 16.2, 1H), 5.77 (d, J_{gem} = 16.2, 1H), 5.17 (pst, J = 4.9, 1H), 4.09 (dd, J_{gem} = 13.8, J_{vic} = 4.3, 1H), 4.01 – 3.85 (m, 4H), 3.33 (dd, J_{gem} = 13.8, J_{vic} = 5.5, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 155.08, 152.41, 152.40, 150.65, 150.64, 142.13, 138.76, 138.13, 137.37, 129.91, 129.58, 129.25, 128.97, 127.30, 124.39, 101.89, 65.28, 55.13, 43.09. HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$ 512.1274; found 512.1358. Anal. calcd. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$: C 51.66, H 4.14, N 19.17; found: C 51.83, H 3.98, N 19.36.

2.14. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of 8-13

A solution of **26** (1 mmol), PPh_3 (1.1 mmol for **8**, 2.2 mmol for **9-13**) and the corresponding purine or 5-FU derivative (1 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was cooled at -20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO_2 . DIAD (1.1 equiv. for **8**, 2.2 equiv. for **9-13**) was added dropwise at -20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The microwave vial was sealed and irradiated at: 140 °C for 25 min (**8, 9, 11, 12**), 160 °C for 1 h (**10**), 100 °C for 10 min (**13**). After completion of irradiation time and cooling to room temperature through rapid pressurized air supply gas-jet, the solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:1) as eluent.

2.14.1. 6-Chloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (**8**)

Yellowish solid (18.5 mg, 14%). Mp: 80-81 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.78 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.38 (d, $J_1=J_2$ = 8.9, 2H), 7.85 (d, $J_1=J_2$ = 8.9, 2H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 7.21 (ddd, J_1 = 7.7, J_2 = 7.7, J_3 = 1.3, 1H), 6.49 (dd, J_1 = 7.7, J_2 = 1.3, 1H), 6.41 (dd, J_1 = 7.7, J_2 = 1.3, 1H), 5.89 (d, J_{gem} = 16.2, 1H), 5.79 (d, J_{gem} = 16.2, 1H), 4.92 (pst, J = 4.1, 1H), 4.26 – 4.07 (m, 1H), 3.99 – 3.77 (m, 4H), 3.41 – 3.28 (m, 1H), 2.07 – 1.95 (m, 1H), 1.89 – 1.75 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 152.52, 152.48, 151.35, 150.67, 146.28, 142.73, 137.70, 136.93, 131.12, 129.86, 129.65, 129.44, 129.23, 126.99, 124.42, 102.06, 65.25, 47.58, 43.93, 32.44.

HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₃H₂₂ClN₆O₆S 545.0932; found 545.1012. Anal. calcd. C₂₃H₂₁ClN₆O₆S: C 50.69, H 3.88, N 15.42; found: C 50.73, H 3.92, N 15.47.

2.14.2. 6-Bromo-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (**9**)

Yellowish solid (45.4 mg, 32%). Mp: 80-81 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.72 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.37 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.84 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.27 (pst, *J*₁=*J*₂= 7.3, 1H), 7.19 (pst, *J*₁=*J*₂= 7.3, 1H), 7.05 (d, *J*= 7.3, 1H), 6.48 (d, *J*= 7.3, 1H), 5.87 (d, *J*_{gem}= 16.1, 1H), 5.78 (d, *J*_{gem}= 16.1, 1H), 4.90 (pst, *J*= 4.0, 1H), 4.24 – 4.08 (m, 1H), 4.00 – 3.75 (m, 4H), 3.40 – 3.25 (m, 1H), 2.08 – 1.94 (m, 1H), 1.87 – 1.74 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 152.52, 151.28, 151.20, 150.64, 146.13, 142.60, 137.35, 136.99, 134.11, 129.86, 129.70, 129.65, 129.59, 126.98, 124.43, 102.00, 65.24, 47.47, 44.12, 32.38. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₃H₂₂BrN₆O₆S 589.0427; found 589.0497. Anal. calcd. C₂₃H₂₁BrN₆O₆S: C 45.92, H 3.33, N 14.61; found: C 45.98, H 3.38, N 14.69.

2.14.3. 2,6-Dichloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (**10**)

White solid (67.2 mg, 32%). Mp: 80-81 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (s, 1H), 8.36 (d, *J*₁=*J*₂= 8.5, 2H), 7.85 (d, *J*₁=*J*₂= 8.5, 2H), 7.30 (pst, *J*₁=*J*₂= 7.5, 1H), 7.22 (pst, *J*₁=*J*₂= 7.5, 1H), 7.06 (d, *J*= 7.5, 1H), 6.48 (d, *J*= 7.5, 1H), 5.80 (d, *J*_{gem}= 16.0, 1H), 5.70 (d, *J*_{gem}= 16.0, 1H), 4.93 (pst, *J*= 3.8, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 1H), 3.97 – 3.72 (m, 4H), 3.33 – 3.21 (m, 1H), 2.04 – 1.93 (m, 1H), 1.84 – 1.71 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153.86, 153.39, 152.05, 150.64, 146.95, 142.62, 137.31, 136.90, 131.51, 130.71, 129.90, 129.61, 129.19, 126.98, 124.43, 101.98, 65.25, 47.33, 43.90, 32.22. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₃H₂₁Cl₂N₆O₆S 579.0542; found 579.0616. Anal. calcd. C₂₃H₂₀Cl₂N₆O₆S: C 47.68; H 3.48, N 14.50; found: C 47.72, H 3.53, N 14.54.

2.14.4. 9-(2-{*N*-[(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-adenine (**11**)

White solid (93.0 mg, 48%). Mp: 172-173 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (s, 1H), 8.36 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.86 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.28 – 7.25 (m, 1H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 7.07 (d, *J*= 7.9, 1H), 6.45 (d, *J*= 7.9, 1H), 5.75 (d, *J*_{gem}= 16.2, 1H), 5.71 (d, *J*_{gem}= 16.2, 1H), 4.91 (pst, *J*= 4.1, 1H), 4.21 – 4.14 (m, 1H), 3.99 – 3.77 (m, 4H), 3.40 – 3.28 (m, 1H), 2.07 – 1.99 (m, 1H), 1.86 – 1.75 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 155.56, 152.95, 150.72, 150.54, 142.93, 141.57, 138.51, 136.55, 129.79, 129.59, 129.28, 129.05, 126.88, 124.38, 119.15, 102.00, 65.20, 47.54, 43.19, 32.42. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₃H₂₄N₇O₆S 526.1431; found 526.1501. Anal. calcd. C₂₃H₂₃N₇O₆S: C 52.56; H 4.41, N 18.66; found: C 52.29, H 4.58, N 18.65.

2.14.5. 3-(2-{*N*-[(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine }phenylmethyl)-3*H*-adenine (**12**)

Yellowish solid (47.4 mg, 25%). Mp: 155-156 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (s, 1H), 8.38 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.85 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8, 2H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.13 (d, *J*= 7.7, 1H), 6.47 (d, *J*= 7.7, 1H), 6.05 (d, *J*_{gem}= 15.8, 1H), 5.88 (d, *J*_{gem}= 15.8, 1H), 4.90 (pst, *J*= 3.9, 1H), 4.29 – 4.11 (m, 1H), 4.03 – 3.73 (m, 4H), 3.41 – 3.24 (m, 1H), 2.04 – 1.90 (m, 1H), 1.90 – 1.74 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154.43, 150.80, 149.80, 148.90, 146.09, 142.42, 137.11, 136.62, 129.98, 129.74, 129.67, 129.20, 127.03, 124.45, 119.15, 101.96, 65.24, 49.36, 47.47, 32.21. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₃H₂₄N₇O₆S 526.1431; found 526.1505. Anal. calcd. C₂₃H₂₃N₇O₆S: C 52.56; H 4.41, N 18.66; found: C 52.32, H 4.30, N 18.78.

2.14.6. 1-(2-{*N*-[(1,3-Dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(*p*-nitrophenylsulfonyl)amine }phenylmethyl)-5-fluorouracil (**13**)

White solid (35.5 mg, 17%). Mp: 128-129 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.85 (d, *J*= 5.0 Hz, 1H), 8.38 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8 Hz, 2H), 7.86 (d, *J*₁=*J*₂= 8.8 Hz, 2H), 7.62 (d, *J*= 5.0 Hz, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 1H), 7.28 (d, *J*= 7.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 6.44 (d, *J*= 7.9, 1H), 5.45 (d, *J*_{gem}= 16.0, 1H), 5.09 (d, *J*_{gem}= 16.0, 1H), 4.88 (pst, *J*= 4.1, 1H), 4.20 – 4.02 (m, 1H), 3.99 – 3.74 (m, 4H), 3.35 – 3.23 (m, 1H), 2.04 – 1.87 (m, 1H), 1.79 – 1.72 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 157.05 (d, *J*= 26.5 Hz), 150.61, 150.13, 142.79, 140.79 (d, *J*= 238.2 Hz), 137.66, 137.13, 130.02, 129.41, 129.29, 129.12 (d, *J*= 32.9 Hz), 128.87, 127.11, 124.44, 101.90, 65.19, 47.55, 47.46, 32.32. HRMS (m/z): [M + Na]⁺ calcd. for C₂₂H₂₁FN₄O₈SNa 543.1064; found 543.0961. Anal. calcd. C₂₂H₂₁FN₄O₈S: C 50.77; H 4.07, N 10.76; found: C 51.00, H 4.09, N 10.43.

2.15. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of **14-17**

A solution of **27** (for **14** and **15**) or **28** (for **16** and **17**) (1.00 mmol), PPh₃ (2.20 mmol) and 2,6-dichloropurine (1.00 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was cooled at - 20 °C under argon atmosphere in a bath with acetone and CO₂. DIAD (2.20 mmol) was added dropwise at - 20 °C and the reaction mixture was left to rise up to 5 °C by adding acetone slowly to the bath. The microwave vial was sealed and irradiated at 160 °C for 25 min. After completion of irradiation time and cooling to room temperature through rapid pressurized air supply gas-jet, the solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography using EtOAc:hexane (1:1) as eluent to yield regioisomers **14** and **16** in one reaction, and derivatives **15** and **17** in the other.

2.15.1. 2,6-Dichloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine
(14)

Yellowish solid (256.8 mg, 62%). Mp: 82-83 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (d, *J* = 7.6, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.06 (dd, *J*₁ = 7.6, *J*₂ = 1.2, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.48 (pst, *J*₁ = *J*₂ = 7.6, 1H), 7.32 (pst, *J*₁ = *J*₂ = 7.6, 1H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.8, 1H), 6.95 – 6.91 (m, 1H), 6.36 (d, *J* = 7.8, 1H), 5.92 (d, *J*_{gem} = 16.1, 1H), 5.82 (d, *J*_{gem} = 16.1, 1H), 5.18 (pst, *J* = 5.0, 1H), 4.24 (dd, *J*_{gem} = 13.9, *J*_{vic} = 4.5, 1H), 4.03 – 3.82 (m, 4H), 3.26 (dd, *J*_{gem} = 13.9, *J*_{vic} = 5.5, 1H), 2.89 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 156.33, 154.07, 153.24, 151.80, 147.51, 138.18, 137.52, 133.19, 131.50, 131.34, 130.65, 130.59, 130.11, 129.26, 128.91, 128.47, 128.19, 127.89, 123.25, 120.03, 115.51, 102.46, 65.14, 55.04, 45.57, 43.90. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₈H₂₇Cl₂N₆O₄S 613.1113; found 613.1202. Anal. calcd. C₂₈H₂₆Cl₂N₆O₄S: C 54.82, H 4.27, N 13.70; found: C 54.89, H 4.32, N 13.78.

2.15.2. 2,6-Dichloro-7-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)methyl]-*N*-(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-7*H*-purine
(16)

Yellowish solid (76.3 mg, 13%). Mp: 89-90 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.05 (dd, *J*₁ = 7.5, *J*₂ = 1.1, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.49 (dd, *J*₁ = 8.4, *J*₂ = 7.5, 1H), 7.33 (dd, *J*₁ = 8.7, *J*₂ = 7.6, 1H), 7.22 – 7.14 (m, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.01 – 6.95 (m, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.0, 1H), 6.43 (d, *J* = 8.0, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.17 (dd, *J* = 5.8, 4.3, 1H), 4.20 (dd, *J*_{gem} = 14.0, *J*_{vic} = 4.3, 1H), 4.02 – 3.76 (m, 4H), 3.22 (dd, *J*_{gem} = 14.0, *J*_{vic} = 5.9, 1H), 2.89 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.52, 153.29, 151.76, 151.65, 144.00, 138.08, 137.75, 132.94, 131.62, 131.48, 130.60, 130.12, 129.40, 129.14, 128.97, 128.26, 127.30, 123.25, 122.58, 119.94, 115.54, 101.96, 65.25, 55.16, 46.98, 45.56. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₈H₂₇Cl₂N₆O₄S 613.1113; found 613.1184. Anal. calcd. C₂₈H₂₆Cl₂N₆O₄S: C 54.82, H 4.27, N 13.70; found: C 54.79, H 4.31, N 13.80.

2.15.3. 2,6-Dichloro-9-(2-{*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(5-dansyl)amine}phenylmethyl)-9*H*-purine (15)

Yellowish solid (317.1 mg, 75%). Mp: 106-107 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.58 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.09 – 8.06 (m, 2H), 7.49 (dd, *J*₁ = 8.5, *J*₂ = 7.5, 1H), 7.33 (dd, *J*₁ = 8.7, *J*₂ = 7.5, 1H), 7.22 – 7.17 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.5, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.49 (dd, *J*₁ = 8.4, *J*₂ = 1.0, 1H), 5.79 (d, *J*_{gem} = 15.9, 1H), 5.73 (d, *J*_{gem} = 15.9, 1H), 4.89 (pst, *J* = 4.1, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 1H), 3.95 – 3.76 (m, 4H), 3.47 – 3.39 (m, 1H), 2.88 (s, 6H), 1.99 – 1.90 (m, 1H), 1.82 – 1.73 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153.92, 153.22, 151.85, 151.74, 147.12, 137.21, 137.00, 133.34, 131.50, 131.22, 130.66, 130.54, 130.08, 129.24, 129.12, 129.04, 128.63, 128.10, 123.28, 120.01, 115.45, 102.20, 65.16, 47.14, 45.55, 43.93, 32.66. HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd. for C₂₉H₂₉Cl₂N₆O₄S 627.1270; found 627.1346. Anal. calcd. C₂₉H₂₈Cl₂N₆O₄S: C 55.50, H 4.50, N 13.39; found: C 55.59, H 4.58, N 13.42.

2.15.4. 2,6-Dichloro-7-(2-(*N*-[(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-*N*-(5-dansyl)amine }phenylmethyl)-7*H*-purine (**17**)

Yellowish solid (30.0 mg, 7%). Mp: 111-112 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.59 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.9, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.5, 1H), 7.49 (dd, *J*₁ = 8.4, *J*₂ = 7.9, 1H), 7.34 (dd, *J*₁ = 8.5, *J*₂ = 7.6, 1H), 7.21 (pst, *J*₁ = *J*₂ = 7.6, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.03 (pst, *J*₁ = *J*₂ = 7.6, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.56 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.07 (d, *J*_{gem} = 16.7, 1H), 5.94 (d, *J*_{gem} = 16.7, 1H), 4.88 (pst, *J* = 4.1, 1H), 4.15 – 4.04 (m, 1H), 3.94 – 3.74 (m, 4H), 3.51 – 3.41 (m, 1H), 2.89 (s, 6H), 1.96 – 1.85 (m, 1H), 1.84 – 1.74 (m, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.67, 153.44, 151.84, 151.47, 144.00, 137.24, 137.14, 133.18, 131.59, 131.37, 130.62, 130.13, 129.45, 129.41, 129.07, 128.18, 127.30, 123.29, 122.40, 119.93, 115.50, 102.16, 65.20, 47.32, 47.15, 45.56, 32.94. HRMS (*m/z*): [*M* + *H*]⁺ calcd. for C₂₉H₂₉Cl₂N₆O₄S 627.1270; found 627.1348. Anal. calcd. C₂₉H₂₈Cl₂N₆O₄S: C 55.50, H 4.50, N 13.39; found: C 55.61, H 4.53, N 13.29.

3. Biological assays

3.1. Tables

3.1.1. Table S1

Compound	MCF-7 (IC ₅₀ μM)	HCT-116 (IC ₅₀ μM)	A-375 (IC ₅₀ μM)
4	12.20 ± 0.080	3.100 ± 0.030	0.663 ± 0.018
5	12.10 ± 0.030	3.060 ± 0.020	1.371 ± 0.039
6	1.170 ± 0.028	15.87 ± 0.030	1.329 ± 0.016
7	15.15 ± 0.040	13.68 ± 0.040	6.549 ± 0.058
8	2.200 ± 0.050	2.620 ± 0.050	0.340 ± 0.009
9	3.260 ± 0.040	2.690 ± 0.060	0.557 ± 0.090
10	3.010 ± 0.008	4.110 ± 0.001	0.134 ± 0.033
11	17.22 ± 0.020	21.3 ± 0.040	6.823 ± 0.045
12	12.57 ± 0.030	13.6 ± 0.040	5.349 ± 0.014
13	27.30 ± 0.080	20.28 ± 0.100	11.23 ± 0.020
14	10.40 ± 0.030	2.910 ± 0.013	0.411 ± 0.030
15	2.610 ± 0.040	2.290 ± 0.020	0.338 ± 0.045
16	2.170 ± 0.070	1.280 ± 0.001	0.566 ± 0.017
17	1.930 ± 0.030	3.300 ± 0.005	0.566 ± 0.017

Table S1. Anti-proliferative activities of the *p*-nitrobenzenesulfonyl (**4-13**) and dansyl (**14-17**) derivatives against the MCF-7, HCT-116 and A-375 cell lines.

3.1.2. Table S2

	IC ₅₀ (μM)		
	A-375 S-	A-375 S+	A-375 NS
8	23.822±0.054	23.410±0.050	8.165±0.017
10	5.242±0.031	6.970±0.026	2.430±0.031

Table S2. Anti-proliferative activities for **8** and **10** against A-375 metastatic melanoma cell line depending on the ALDH activity. S+, for positive ALDH activity cells; S-, for negative ALDH activity cells and NS for cells growing in a sphere forming medium without sorter enrichment process (called no sorter).

3.1.3. Table S3

	Control	4	5	6	8	9	10
G₀/G₁	40.55 ± 0.70	47.42 ± 3.46	33.69 ± 4.34	40.22 ± 1.28	28.25 ± 3.02	26.38 ± 1.80	38.68 ± 2.55
G₂/M	8.71 ± 0.93	10.62 ± 1.23	26.60 ± 1.15	9.93 ± 0.93	34.40 ± 1.84	37.27 ± 1.94	21.36 ± 1.53
S	50.75 ± 0.23	41.96 ± 2.23	39.72 ± 5.49	49.86 ± 0.35	37.26 ± 1.33	36.35 ± 3.73	40.16 ± 0.73
*24 h of treatment							
	Control	14	15	16	17		
G₀/G₁	65.75 ± 1.33	66.69 ± 0.59	62.36 ± 0.06	67.34 ± 0.33	69.82 ± 3.11		
G₂/M	12.42 ± 0.87	11.06 ± 0.49	12.31 ± 0.01	9.85 ± 0.21	8.49 ± 0.05		
S	21.84 ± 0.47	22.26 ± 0.10	25.34 ± 0.05	22.83 ± 0.53	21.70 ± 3.16		
*24 h of treatment							
	Control	4	5	6	8	9	10
G₀/G₁	40.86 ± 1.14	34.23 ± 0.69	39.88 ± 4.62	42.79 ± 0.91	41.19 ± 2.43	41.09 ± 0.50	32.78 ± 2.87
G₂/M	19.75 ± 0.67	24.32 ± 0.38	20.34 ± 17.40	19.80 ± 0.88	38.00 ± 4.04	32.88 ± 10.89	15.31 ± 2.14
S	39.37 ± 0.47	41.46 ± 1.07	39.78 ± 12.77	37.42 ± 0.03	20.82 ± 6.47	26.03 ± 10.39	49.43 ± 1.49
*48 h of treatment							
	Control	14	15	16	17		
G₀/G₁	68.02 ± 3.01	60.02 ± 0.54	59.33 ± 2.93	58.56 ± 0.55	67.80 ± 0.82		
G₂/M	10.49 ± 1.66	13.73 ± 0.26	13.37 ± 1.80	10.92 ± 0.97	7.46 ± 0.28		
S	21.50 ± 1.35	26.26 ± 0.80	27.30 ± 1.13	30.53 ± 0.42	27.75 ± 3.13		
*48 h of treatment							

Table S3. Percentage of cell cycle distribution in the A-375 cancer cell line after treatment for 24 and 48 h for the ten most active compounds **4-6**, **8-10** and **14-17** as anti-proliferative agents ($3 \times IC_{50}$). All experiments were conducted in triplicate and gave similar results. The data are means \pm SEM of three independent determinations.

3.1.4. Table S4

	Control	4	5	6	8	9	10
N	0.45 ± 0.21	0.15 ± 0.07	1.45 ± 0.35	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.00	26.38 ± 1.80	0.45 ± 0.07
ESA	2.85 ± 0.35	30.30 ± 3.82	35.35 ± 4.17	8.85 ± 1.63	67.10 ± 1.41	71.25 ± 4.03	31.42 ± 0.59
LSA	4.30 ± 0.14	4.20 ± 0.71	36.45 ± 5.44	2.45 ± 0.21	8.80 ± 2.12	13.30 ± 6.22	30.35 ± 0.35
*24 h of treatment							
	Control	14	15	16	17		
N	0.70 ± 0.14	0.80 ± 0.28	0.90 ± 0.14	0.80 ± 0.42	0.60 ± 0.00		
ESA	2.30 ± 0.42	4.00 ± 0.85	5.05 ± 1.34	3.75 ± 0.64	5.15 ± 0.49		
LSA	1.15 ± 0.07	2.60 ± 0.14	5.35 ± 0.92	2.85 ± 0.78	2.25 ± 0.49		
*24 h of treatment							
	Control	4	5	6	8	9	10
N	0.40 ± 0.14	0.95 ± 0.21	4.50 ± 0.14	0.35 ± 0.07	2.40 ± 0.14	2.25 ± 0.49	1.60 ± 0.28
ESA	2.80 ± 0.42	13.20 ± 1.41	5.85 ± 0.49	2.15 ± 0.07	26.00 ± 0.14	25.45 ± 1.34	5.50 ± 0.57
LSA	2.70 ± 0.28	7.30 ± 0.99	65.25 ± 0.21	1.70 ± 0.28	56.95 ± 4.88	58.05 ± 2.75	25.2 ± 1.13
*48 h of treatment							
	Control	14	15	16	17		
N	0.70 ± 0.04	1.35 ± 0.78	0.90 ± 0.28	0.75 ± 0.21	0.65 ± 0.07		
ESA	2.30 ± 0.42	2.95 ± 0.92	14.05 ± 0.21	3.30 ± 0.00	5.70 ± 0.71		
LSA	2.15 ± 0.07	2.40 ± 0.57	10.25 ± 0.78	2.60 ± 0.99	2.45 ± 0.07		
*48 h of treatment							

Table S4. Apoptosis induction in the A-375 cell line after treatment for 24 and 48 h ($3 \times IC_{50}$). The data indicate the percentage of cells undergoing apoptosis in each sample. All experiments were conducted in triplicate and gave similar results. The data are means \pm SEM of three independent determinations. N= Necrosis, ESA= Early-stage apoptosis, LSA= Late-stage apoptosis.

3.2. Cell culture

MCF-7, HCT-116 and A-375 cells were grown at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, with Dubelcco's modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 2% L-glutamine, 2.7% sodium bicarbonate, 1% HEPES buffer, 40 mg/L gentamicin and 500 mg/L ampicillin.

3.2.1. Aldehyde dehydrogenase assay and separation of ALDH-positive cell subpopulation by FACS

The isolation of CSCs from A-375 melanoma cell line was carried out using the Aldefluor kit (Stem Cell Technologies), which detects the activity of ALDH. Experiments were undertaken according to the manufacturer's instructions. Cells were suspended in ALDEFLUOR assay buffer containing ALDH substrate (BAAA, 1 μ mol/L per 1×10^6 cells) and incubated during 40 min at 37°C. As a negative control, for each sample, an aliquot was treated with 50mmol/L of diethylaminobenzaldehyde (DEAB) (Sigma), a specific ALDH inhibitor. The brightly fluorescent ALDH-expressing cells (ALDH⁺ cells) were detected in the green

fluorescence channel (520-540 nm) of a FACScan Aria III. The sorting gates were established using as negative controls the cells stained with propidium iodide (Sigma) only. Each experiment was repeated three times.

All cells were washed with PBS and resuspended in spheres culture medium (DMEM:F12, 1% Penicillin/Streptomycin, B27, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ITS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hydrocortisone, 4 ng/mL Heparin, 10 ng/mL EGF, 20 ng/mL FGF) in ultra-low adherence 6-wells plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂.²

3.3. Drug treatment

Compounds were dissolved in DMSO and stored at -20 °C. For each experiment, the stock solutions were further diluted in medium to obtain the desired concentrations. The final solvent concentration in cell culture was $\leq 0.1\%$ v/v of DMSO, a concentration without any effect on cell replication. Parallel cultures of MCF-7, HCT-116 and A375 cells in medium with DMSO were used as controls.

3.4. Proliferation assays

The effect of the compounds on cell viability was assessed using the sulforhodamine-B (SRB) colorimetric assay. Cells suspension (1×10^3 cells/well) were seeded onto 24-well plates and incubated for 24 h. The cells were then treated with different concentrations of drugs in their respective culture medium and maintained with the treatment for 3 days. Three days later, wells were aspirated, and fresh medium and drug were added. Then cell cultures were maintained for 3 additional days. Thereafter, we used a Titertek Multiscan (Flow, Irvine, California) at 492 nm. We evaluated linearity of the SRB assay with a cell number for each cell stock before each cell growth experiment. The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) values were calculated from semi-logarithmic dose-response curves by linear interpolation. All of the experiments were plated in triplicate wells and were carried out twice.

3.4.1. MTS cell viability assay

Enriched subpopulation of A-375 CSCs was seeded in a concentration of 3000 cells/well in ultra-low adherence 96-well plates in sphere cultured medium and treated with different compounds concentrations. After 72 h, 10 μL of CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS (10 mg/mL) (Promega Corporation, Madison, USA) was added to each well and incubated at 37°C for 2-4 h. Plates were read at 570 nm on a Bio-Rad plate reader.

3.5. Cell cycle distribution analysis

The cells at 70% confluence were treated with either DMSO alone or with concentrations of the compounds determined at their $3 \times IC_{50}$ dose values). FACS analysis was performed after 48 h of treatment as described.³All experiments were performed in triplicate and yielded similar results.

3.6. Apoptosis detection by staining with annexin V-FITC and propidium iodide

The annexin V-FITC apoptosis detection kit I (Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used to detect apoptosis by flow cytometry according to our previous published protocol.³ Apoptosis inductions in the MCF-7, HCT-116 and A-375 human cancer cell lines after treatment for 48 h were determined for the compounds at doses of their corresponding $3 \times IC_{50}$ values. All experiments were performed in triplicate and yielded similar results.

3.7. Fluorescence detection and confocal imaging

MCF-7 breast cancer cells, HCT-116 colon cancer cells and A-375 melanoma cells were seeded on 96 wells plates (1×10^3 cells/well) and treated with 10 μ M of **15** for 30 min, 1h and 2h. After that, 96 wells plates were read on PowerWave X (Biotek Instruments, Inc) ($\lambda_{ex}=340/30$; $\lambda_{em}=450/450$). A-375 melanoma cells were harvested on 13 mm ϕ coverslips in a 24 well plate, and were treated for 30 minutes, 1 h and 2 h with a concentration of 10 μ M of **15**. Imaging experiments were conducted with a Zeiss LSM 710 laser-scanning microscope using a tissue culture chamber (5% CO₂, 37 °C) with a Plan-Apochromat 63 \times /1.40 Oil DIC m27. Images were processed with Zen Lite 2012 software.

3.8. *In vivo* acute toxicity

Acute toxicity was determined in six weeks old BALB/c mice. Compounds **10** and **15** dissolved in methylcellulose 1% were administered in a single oral bolus (n = 40) at dose levels of 50, 75, 100, 150 and 250 mg/kg every day for seven days. Control mice were (n = 10) inoculated with the same volume of methylcellulose. Mice were maintained under standard conditions and for each treatment schedule, were weighed and assessed twice weekly for systemic toxicity (listlessness, weight loss) and local toxicity (alopecia, skin reaction, and leg motility) for 14 days.

3.9. *In vivo* distribution assay

For the *in vivo* distribution assay mice were treated with **10** and **15** at a dose of 100 mg/kg by oral administration. After six hours mice were sacrificed by cervical dislocation. Immediately, organs (kidney, pancreas, heart, lung and liver) were extracted by necropsy and images were acquired by an IVIS Spectrum imaging system (Caliper Life Sciences, 68 Elm Street Hopkinton, MA 01748, USA) using the 465/520nm, 430/520 nm and 430/540 nm excitation/emission filters.

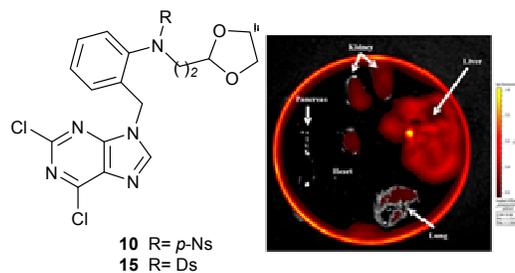
3.10. Statistical analyses

All the quantitative data in the present study are reported as means \pm standard derivation from at least three independent experiments. Two-way ANOVA was used for grouped analysis of differences followed by Bonferroni post-tests.

4. References

1. J. Mulzer, *J Org Chem*, 2000, **65**, 6540.
2. M. Díaz-Gavilán, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Gómez-Vidal, J. A. Marchal, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 11547.
3. E. Charafe-Jauffret, C. Ginestier, F. Iovino, C. Tarpin, M. Diebel, B. Esterni, G. Houvenaeghel, J. M. Extra, F. Bertucci, J. Jacquemier, L. Xerri, G. Dontu, G. Stassi, Y. Xiao, S. H. Barsky, D. Birnbaum, P. Viens, M. S. Wicha, *Clin Cancer Res*, 2010; **16**, 45.
4. J. A. Marchal, H. Boulaiz, I. Suárez, E. Saniger, J. Campos, E. Carrillo, J. Prados, M. A. Gallo, A. Espinosa, A. Aránega, *Invest New Drug*, 2004, **22**, 379.

Table of contents entry



The most potent *p*-nitrobenzene sulfonamide (**10**) shows an IC_{50} in the nanomolar range against the A-375 cell line. Its dansyl analogue (**15**) is absorbed by the oral route with systemic distribution, accumulating mainly in liver and kidney. Both compounds are nontoxic to BALB/c mice at dose of 250 mg/kg after 2 weeks.