



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de la acción antitumoral de una tiosemicarbazona N4 aril sustituida sobre el cáncer de mama triple negativo

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

Aldana María Sólimo

Directora de Tesis: Dra. Mariana Alejandra Callero

Consejera de Estudios: Dra. Silvina Gazzaniga

Lugar de Trabajo: Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Área
Investigación – Universidad de Buenos Aires

Contenido

Presentaciones.....	4
Resumen	6
Abstract.....	7
Agradecimientos.....	8
1 Introducción.....	10
1.1 Cáncer	11
1.1.1 Metástasis	12
1.1.2 Transición epitelio-mesenquimática (TEM) y vía de señalización de Wnt	13
1.1.3 Cáncer de mama	15
1.1.3.1 Epidemiología.....	16
1.1.3.2 Clasificación y cáncer de mama triple negativo (CMTN)	17
1.1.3.3 Resistencia y Cancer Stem Cells (CSC)	22
1.2 Tiosemicarbazonas (TSCs)	23
1.2.1 Síntesis y características	23
1.2.2 Aplicaciones	24
1.2.2.1 TSCs en cáncer y rol de NDRG1.....	25
1.2.3 TSCs <i>N</i> ⁴ aril sustituidas derivadas de 1-indanonas	27
2 Hipótesis de Trabajo y Objetivos	29
3 Materiales y Métodos	31
3.1 T2.....	32
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	32
3.2.1 Líneas celulares	32
3.2.2 Citotoxicidad	33
3.2.3 Formación de colonias.....	33
3.2.4 Cuantificación de apoptosis	33
3.2.5 Ensayo de migración	34
3.2.6 Zimografía	34
3.2.7 Ensayo de invasión <i>transwell</i>	35
3.2.8 Formación y tratamiento de mamosferas	35
3.2.9 Citometría para determinación de la subpoblación <i>stem</i>	36
3.2.10 qRT-PCR y <i>Stem loop</i> PCR.....	36
3.2.11 <i>Western Blot</i>	38
3.2.12 Inmunofluorescencia.....	39
3.2.13 Transfección con plásmido reportero.....	40

3.3	Experimentos <i>in vivo</i>	41
3.3.1	Animales.....	41
3.3.2	Dosis Máxima Tolerada	41
3.3.3	Metástasis experimentales	42
3.3.4	Crecimiento tumoral subcutáneo y metástasis espontáneas	42
3.3.5	Análisis histopatológico de tumores.....	42
3.3.6	Crecimiento tumoral intraductal y <i>whole mount</i>	43
3.3.7	Inmunofluorescencia de tejido.....	43
3.4	Análisis estadístico	44
4	Resultados.....	46
4.1	Efecto citotóxico de T2	47
4.2	T2 induce muerte celular por apoptosis en la línea 4T1	48
4.3	T2 disminuye la capacidad clonogénica de las células 4T1	50
4.4	T2 reduce la capacidad migratoria de las células 4T1	52
4.5	T2 reduce la capacidad invasiva de la línea celular 4T1	53
4.6	T2 reduce el número y la capacidad autorrenovativa de la subpoblación <i>stem</i> en la línea celular 4T1.....	55
4.7	T2 reduce la capacidad de formar metástasis experimentales de las células 4T1 ...	59
4.8	T2 induce un fenotipo más epitelial en las células 4T1.....	61
4.9	T2 induce la expresión de NDRG1 de forma post transcripcional	64
4.10	T2 inhibe la TEM regulando negativamente la vía de Wnt- β -catenina	65
4.11	Modelo murino subcutáneo.....	70
4.11.1	La administración intraperitoneal de T2 no produce efectos adversos en ratones BALB/c	70
4.11.2	T2 reduce el crecimiento y capacidad invasiva de tumores 4T1 en ratones BALB/c.....	72
4.12	Modelo murino intraductal.....	76
4.12.1	Optimización del modelo	76
4.12.2	Caracterización	78
4.12.3	T2 reduce la capacidad invasiva de las células 4T1 en el modelo intraductal	80
4.12.4	T2 reduce la expresión de β -catenina de las células 4T1 en el modelo intraductal.....	82
5	Discusión	84
6	Conclusión.....	95
7	Bibliografía.....	97

Presentaciones

Los resultados de la presente tesis fueron informados mediante las siguientes publicaciones y comunicaciones:

Publicación en revista internacional:

- *“Anti-metastatic action of an N⁴-aryl substituted thiosemicarbazone on advanced triple negative breast cancer”*. AM Sólino, MC Soraires Santacruz, S Vanzulli, O Coggiola, E Bal de Kier Joffe, L Finkielsztein, MA Callero. Heliyon, Oct 2020, DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05161

Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- *“Inhibition of epithelial-mesenchymal transition and Wnt canonical pathways as possible mechanisms of T2 antitumor action on triple negative breast cancer”*. Sólino Aldana, Filkiensztein Liliana, Callero Mariana. LXVIII Reunión Anual De La Sociedad Argentina De Investigación Clínica (SAIC), XXV Jornadas Anuales Anual de la Sociedad Argentina de Biología (SAB), LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (AAFE), VIII Reunión Científica de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL), 2023.
- *“Mouse triple negative breast cancer 4T1 intraductal model characterization for future studies of T2 action”*. Sólino Aldana, Filkiensztein Liliana, Eiján, Ana María, Lodillinsky Catalina, Callero Mariana. LXVII Reunión Anual De La Sociedad Argentina De Investigación Clínica (SAIC), LXX Reunión Anual De La Sociedad Argentina De Inmunología (SAI) & 3er Congreso Franco-Argentino De Inmunología (FAIC), Reunión Anual 2022 De La Sociedad Argentina De Fisiología (SAFIS), 2022.
- *“An N⁴-aryl substituted thiosemicarbazone modulates miRNAs and decreases invasiveness and dissemination in 4T1 triple negative murine mammary cancer”*. Sólino Aldana, Soraires Santa Cruz Ma. Cristina, Loaiza Perez Andrea, Bal de Kier Joffé Elisa, Finkielsztein Liliana & Callero Mariana. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LXVI Reunión Anual de la Sociedad

Argentina de Inmunología y Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, 2018.

- *“La Tiosemicarbazona N⁴-aryl sustituida, T2, modula la invasividad y la diferenciación celular en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo”*. Sólimo Aldana, Soraires Santa Cruz Ma. Cristina, Loaiza Perez Andrea, Bal de Kier Joffé Elisa, Finkielsztejn Liliana y Callero Mariana. XXXIII Jornadas Multidisciplinarias de Oncología, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, 2018.
- *“Effects of an N⁴-aryl substituted thiosemicarbazone on the metastasis of triple negative 4T1 mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo”*. Sólimo A., Soraires Santacruz M.C., Loaiza Perez A.I., Bal de Kier Joffé E., Finkielsztejn L., Callero M.A. IV International Congress in Translational Medicine, 2018.
- *“An N⁴-Aryl substituted thiosemicarbazone down-modulates metastasis-related properties of triple negative 4T1 mouse mammary cancer cells”*. Aldana Sólimo, María Cristina Soraires Santacruz, Andrea Loaiza Perez, Elisa Bal de Kier Joffé, Liliana Finkelstein, Mariana A Callero. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular, LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Reunión de la Sociedad Argentina de Andrología, XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, XIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biología, XLIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental, Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, Reunión de la Sociedad Argentina de Hematología, XXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Protozoología, 2017.

Resumen

Estudio de la acción antitumoral de una tiosemicarbazona *N*⁴ aril sustituida sobre el cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres y el subtipo triple negativo (CMTN) suele ser el de presentación más agresiva. En este trabajo se propuso estudiar la acción de la tiosemicarbazona T2 sobre el modelo murino de CMTN 4T1 *in vitro* e *in vivo* en modelos de inoculación subcutánea e intraductal.

Los resultados obtenidos mostraron que T2 posee efecto citotóxico similar en líneas de CMTN de origen humano y murino. En las células 4T1, el tratamiento con T2 *in vitro* resultó en la inducción de apoptosis junto con una reducción de la subpoblación *stem*. Tanto *in vitro* como *in vivo*, las células tratadas con T2 mostraron un fenotipo más epitelial y disminución de las capacidades invasiva y metastásica. Entre los mecanismos de acción de T2 se encuentran la modulación positiva de la proteína supresora de metástasis NDRG1 y la inhibición de la vía de señalización Wnt- β -catenina.

Estos resultados sugieren que T2 podría ser considerada para futuros estudios como terapia alternativa y/o complementaria en el tratamiento del CMTN.

Palabras clave:

Cáncer de mama triple negativo

Tiosemicarbazona

Metástasis

NDRG1

Wnt- β -catenina

Abstract

Study of the antitumor effect of an N^4 aryl substituted thiosemicarbazone on triple negative breast cancer

Breast cancer is the main cause of cancer death in women worldwide while triple negative breast cancer (TNBC) is usually its most aggressive subtype. In this thesis, we studied the action of the thiosemicarbazone T2 on the 4T1 mouse TNBC model *in vitro* and *in vivo* by subcutaneous and intraductal cell inoculation.

Results show that T2 exerts a similar cytotoxic effect on TNBC human and murine cell lines. *In vitro* treatment with T2 on 4T1 cells led to cell death by apoptosis and the reduction of the stem cell subpopulation. Besides, T2-treated cells showed a more epithelial phenotype along with a reduction of their invasive and metastatic abilities, both *in vitro* and *in vivo*. Among T2 mechanisms, we observed an upregulation of the metastasis suppressor NDRG1 and an inhibition of Wnt- β -catenin signaling.

These results suggest that T2 could be considered for further studies as an alternative and/or complementary therapy for TNBC.

Keywords:

Triple negative breast cancer

Thiosemicarbazone

Metastasis

NDRG1

Wnt- β -catenin

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires donde me formé y al CONICET que me permitió llevar a cabo este trabajo.

A mi directora, Mariana, que me acompañó a lo largo de este camino que empezó hace poco más de nueve años cuando llegué a ella siendo estudiante y queriendo saber si el trabajo de mesada era para mí antes de embarcarme en una tesina de licenciatura. Con paciencia y dedicación me enseñó no sólo a trabajar en el laboratorio, sino que me enseñó a pensar, a tener criterio y hacer uso de los recursos disponibles. No podría haber tenido una mejor directora.

A Liliana por ser parte de este proyecto y por su perseverancia, por no haberse rendido ante los problemas.

A Elisa por sus valiosos aportes y por la confianza que me da saber que esta tesis pasó por sus manos.

A los investigadores del Roffo por el apoyo y la paciencia que han demostrado desde el primer día. A todo el personal del Instituto que hace posible su funcionamiento. A las técnicas de Bioterio que me enseñaron a trabajar con ratones a conciencia y al personal de Patología y del Laboratorio Central que se tomaron el trabajo de ayudar con el procesamiento de muestras.

A mis compañeros becarios, actuales y pasados, por generar el mejor ambiente de trabajo, siempre dispuestos a ayudar y aconsejar. A Ju, Maru, Liz, Agus, Maca, Ima, Andi y Flor que fueron mis pilares durante todos estos años.

A Ju, mi compañera de cursada, de escritorio, de escritura y, por momentos, la voz de mi conciencia. Perdón por pedir tu opinión para todo y gracias por siempre responder.

A Maru por las sesiones de escritura, estrés y catarsis. Por siempre tener la palabra justa y, por sobre todo, honesta.

A Marian por el cariño y el compañerismo, por siempre estar presente.

A Gabi por ser de esos jefes que generan un ambiente relajado y descontracturado.

A Lucas por compartir su experiencia y demostrar lo que es una verdadera mente abierta.

A Cata por habernos enseñado cómo trabajar con el modelo intraductal, por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Deni y a Elsi por los abrazos que llenan de energía.

A mis papás que siempre me impulsaron para que hiciera lo que me gusta. Gracias por ser mi audiencia de práctica para todas las presentaciones. Creo que a esta altura conocen mi tema de trabajo tanto o más que yo.

A Iri y a Richard que me han tolerado y acompañado con todo el estrés y la ansiedad que conlleva el cierre de esta etapa.

A Vero que inició todo esto cuando hace casi 20 años me dijo: ¿Por qué no estudiás Biología?

A todos mis amigos, familiares y colegas. No estaría donde estoy ni sería quien soy sin ustedes.

1

Introducción

1.1 Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es un gran conjunto de enfermedades que puede empezar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen y se dividen sin control (*World Health Organization, n.d.*). Este crecimiento puede formar un tumor, el cual puede ser benigno o maligno si, además, posee la capacidad de expandirse y colonizar tejidos adyacentes o distantes (metástasis).

A nivel genético, se trata de una enfermedad en la que se acumulan mutaciones heredadas de los progenitores, adquiridas por errores en la duplicación del ADN y/o por exposición a algún agente genotóxico. También influyen la aparición de alteraciones epigenéticas y la interacción con el ambiente y la microbiota (*National Cancer Institute, n.d.*; Sepich-Poore *et al.*, 2021).

Las alteraciones características de las células cancerosas han sido agrupadas en lo que se conoce como “*hallmarks* del cáncer” (Hanahan y Weinberg, 2000) cuya última revisión (Hanahan, 2022) incluye catorce parámetros y procesos biológicos entre los que se encuentran: la señalización proliferativa sostenida, la evasión de inhibidores del crecimiento, la evasión de la destrucción inmune, la inmortalidad replicativa, la promoción de inflamación, la activación de invasión y metástasis, la inducción de angiogénesis, la inestabilidad genómica y mutación, la resistencia a la muerte celular, la reprogramación metabólica y epigenética, los microbiomas polimórficos, la senescencia celular y la plasticidad fenotípica.

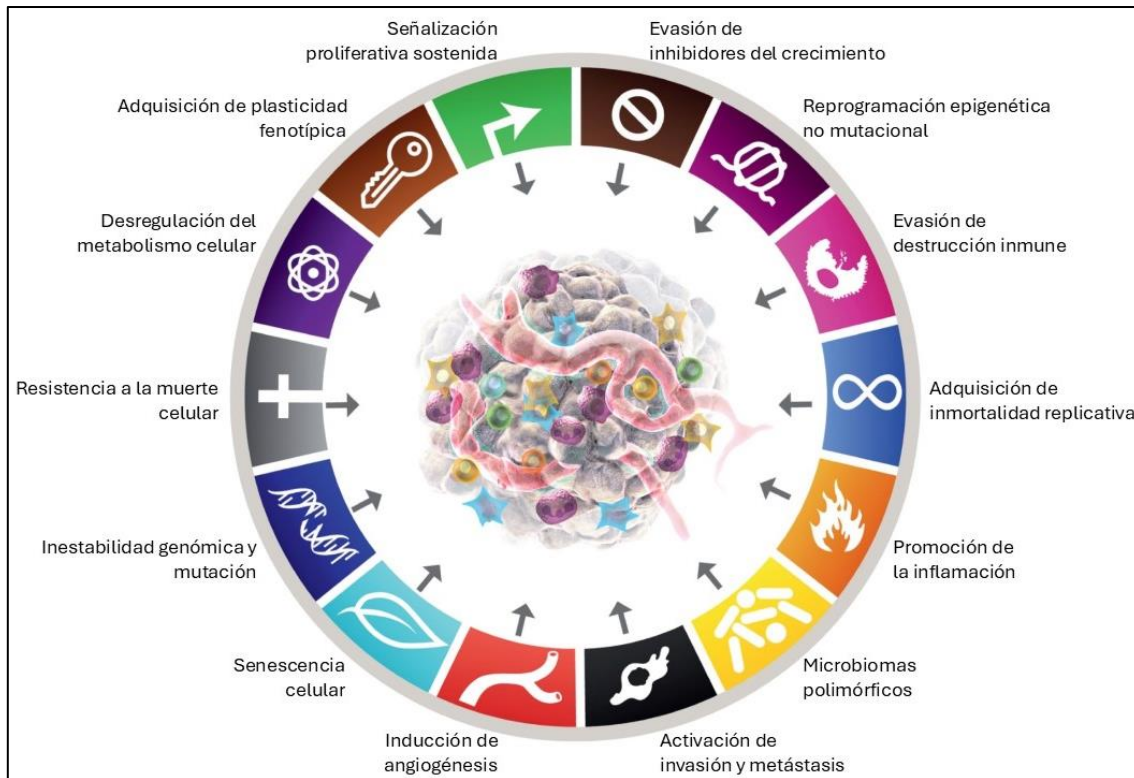


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Adaptado de Hanahan, 2022.

1.1.1 Metástasis

Según la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer, se estima que en 2022 hubo 20 millones de casos nuevos y 9.7 millones de muertes por cáncer (Bray *et al.*, 2024), siendo la principal causa de muerte el desarrollo de enfermedad metastásica (Steeg, 2016).

Usualmente se describe al proceso de formación de metástasis como una secuencia de eventos lineales que involucran a una única célula y consisten en la invasión del tejido periférico al tumor, intravasación a la microvasculatura, circulación en vasos sanguíneos o linfáticos, extravasación y colonización del sitio secundario. Sin embargo, hay evidencia que sugiere múltiples vías paralelas para la diseminación y el crecimiento de las células tumorales dependiendo del microambiente local, el estado del endotelio y el sistema inmune. Es debido a la existencia de estas vías paralelas que resulta sumamente complejo prevenir y tratar la metástasis tumoral (Katt *et al.*, 2018).

Durante la invasión, las células tumorales escapan del tumor primario gracias a su plasticidad fenotípica. Usualmente, las células tumorales pasan de tener un fenotipo más bien epitelial con fuertes uniones célula-célula a uno más mesenquimal donde se pierde la adhesión intercelular y se favorecen la degradación de la matriz extracelular y la migración, aunque este evento puede variar según el tipo de tumor y el grado de diferenciación de sus células. A este cambio fenotípico se lo conoce como transición epitelio-mesenquimática (TEM) y representa uno de los aspectos clave en el estudio de la prevención de la enfermedad metastásica (Majidpoor y Mortezaee, 2021).

Las células que logran desprenderse del tumor primario se valen de varios mecanismos para sobrevivir incluyendo la reprogramación metabólica para utilizar las fuentes de energía disponibles, la evasión de la muerte por *anoikis* al separarse de su matriz extracelular, el uso de plaquetas como protección dentro del torrente sanguíneo y la inmunosupresión. Al llegar a un órgano o tejido secundario pueden proliferar para formar el foco metastásico o entrar en un estado de latencia conocido como *dormancy* (Aguirre-Ghiso, 2007; Hedley y Chambers, 2009).

Dada la complejidad de la enfermedad metastásica, resulta importante para el abordaje de su prevención y tratamiento, desarrollar terapias que apunten a los múltiples aspectos y procesos involucrados tanto de las células tumorales como no tumorales, del microambiente tumoral y del nicho pre-metastásico.

1.1.2 Transición epitelio-mesenquimática (TEM) y vía de señalización de Wnt

Dentro de los grandes blancos para el tratamiento y prevención de la metástasis se encuentran la TEM y las distintas vías de señalización que participan en su desarrollo. El inicio del proceso se caracteriza por la pérdida de expresión

de E-cadherina, molécula fundamental para mantener la adhesión entre células. Entre los factores de transcripción que suprimen su expresión se encuentran Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 (Comijn *et al.*, 2001; Eger *et al.*, 2005; Nieto, 2002; J. Yang *et al.*, 2004) cuya expresión es regulada por múltiples vías de señalización entre las que se destacan TGF- β /Smad, Wnt, Notch, TNF- α /NF- κ B y receptor de tirosina quinasa (Wang y Zhou, 2011).

Una de las vías más destacadas es la de Wnt, la cual es fundamental tanto en procesos de diferenciación durante la embriogénesis, en la regulación de células madre y en la proliferación, la división, la migración y la polaridad celulares, así como en la homeostasis y la reparación tisular. Hay tres grandes mecanismos dentro de la señalización de Wnt, usualmente divididos en vías canónica y no canónica. La vía canónica es dependiente de β -catenina mientras que en la señalización no canónica los ligandos Wnt activan la vía de polaridad celular planar (orientación coordinada de las células en el plano del tejido) y una vía dependiente de calcio que modula la concentración intracelular de este catión y regula negativamente la señalización por β -catenina (James *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2017).

Cuando la vía Wnt- β -catenina (Figura 2) se encuentra inactiva, la β -catenina sintetizada por la célula se encuentra mayormente secuestrada en membrana plasmática mediante su interacción con E-cadherina, manteniendo las uniones entre células y modulando al citoesqueleto de actina en conjunto con las cateninas α , γ y p120. La escasa β -catenina citoplasmática es degradada por la acción de un complejo de destrucción formado por axina, adenomatosis poliposis coli (APC) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), entre otras proteínas, que la marca para ubiquitinación y posterior digestión por proteasoma (Hayat *et al.*, 2022; Valenta *et al.*, 2012).

La interacción de ligandos Wnt con los receptores *Frizzled* y LRP5 o LRP6 resulta en la activación de *Dishevelled* que lleva al secuestro del complejo de

destrucción de β -catenina en membrana y a su inactivación por fosforilaciones (Gao y Chen, 2010) al mismo tiempo que se induce la liberación de la β -catenina acumulada en membrana por la interacción cruzada con la vía de Akt (Fang *et al.*, 2007; Fukumoto *et al.*, 2001). La β -catenina acumulada en citoplasma transloca al núcleo y coopera con otros factores de transcripción como los del tipo TCF/LEF para inducir la transcripción de sus genes blanco (Clevers, 2006) que en células tumorales favorecen la TEM, la migración, la invasión, la proliferación y el mantenimiento de la población *stem* (Xu *et al.*, 2015).

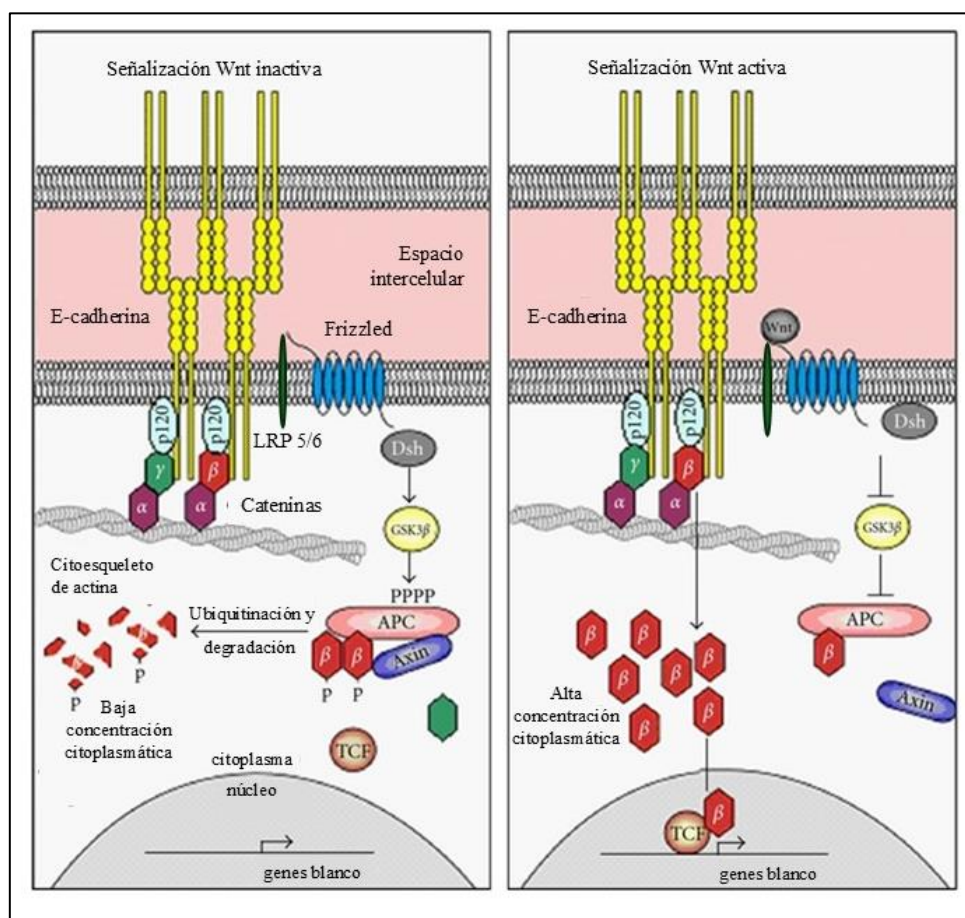


Figura 2. Señalización canónica Wnt- β -catenina. Adaptado de Tian *et al.*, 2011.

1.1.3 Cáncer de mama

La glándula mamaria es una característica distintiva de los mamíferos. Responsable de la producción de leche, la mama es una glándula apocrina: la sección apical de la célula secretora y una porción de su citoplasma son parte de

la secreción. Se encuentra en la fascia superficial, superpuesta a los músculos pectoral e intercostal y rodeada por una cantidad variable de tejido adiposo.

Durante la infancia, las mamas de los humanos consisten en unos pocos ductos y su verdadero desarrollo en las mujeres comienza en la pubertad debido a los efectos del estrógeno y la progesterona. La mama de una mujer adulta contiene 15-20 ductos colectores que desembocan en el pezón. Estos ductos se encuentran conectados a otros ductos que terminan en unidades lobulillares responsables de la producción de leche. Los ductos mamarios están formados por una pared de células epiteliales rodeadas por una capa de células mioepiteliales, sostenidas por estroma de tejido conectivo y tejido adiposo (Khan *et al.*, 2024). La mayoría de los tumores malignos de mama son carcinomas que surgen de las células epiteliales que forman parte de los ductos (Bombonati y Sgroi, 2011).

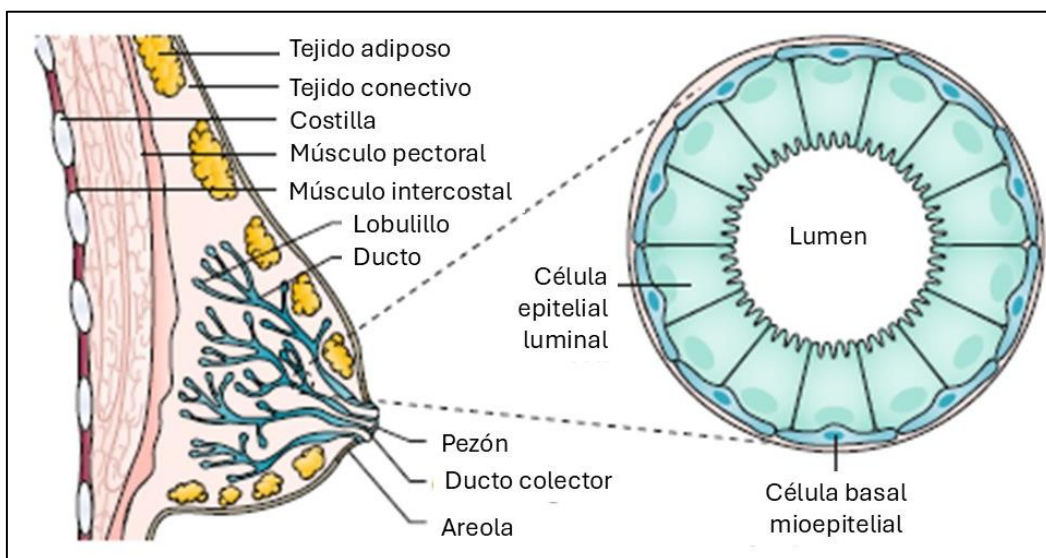


Figura 3. Estructura de la glándula mamaria. Adaptado de Harbeck *et al.*, 2019.

1.1.3.1 Epidemiología

El cáncer de mama es la patología oncológica más común en mujeres (24,5% de los casos de cáncer totales) y representa su principal causa de muerte por cáncer (15,5%) (Bray *et al.*, 2024; Ferlay *et al.*, 2021; Sung *et al.*, 2021). En Argentina, el 32,1% de los cánceres diagnosticados en mujeres son de mama con

una incidencia de 73,1 casos cada 100.000 mujeres. Este valor la convierte en la enfermedad con mayor frecuencia en esta población y, además, presenta la mayor tasa de mortalidad (18,1 cada 100.000) con respecto a otros tipos de cáncer (*Cancer Today*, n.d.).

Más allá del género —el cáncer de mama masculino es muy poco frecuente— el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de este tipo de cáncer es la edad. Su aparición es más común en mujeres de entre 40 y 60 años (Sun *et al.*, 2017), sin embargo, en mujeres más jóvenes tiende a presentar un comportamiento más agresivo (Han *et al.*, 2004; Narod, 2012). Por otro lado, contar con antecedentes de elevados niveles de estrógeno, tanto de manera natural como mediante el uso prolongado de anticonceptivos o terapia de reemplazo hormonal (postmenopausia), puede tener un impacto significativo en el desarrollo de esta patología (Beaber *et al.*, 2014; Narod, 2011). También son relevantes los antecedentes familiares de cáncer de mama y el estilo de vida que incluye, sin estar limitado a, la obesidad, una dieta rica en grasas, el consumo de alcohol y el cigarrillo. En mujeres en etapa postmenopáusica, un índice de masa corporal elevado aumenta la probabilidad de padecer cáncer de mama (Liu *et al.*, 2018).

1.1.3.2 Clasificación y cáncer de mama triple negativo (CMTN)

El término “cáncer de mama” se refiere a un grupo heterogéneo de tumores por lo que resulta útil tener un sistema clasificatorio que permita agrupar a aquellos con características similares con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Existen distintos esquemas de clasificación basados en las características histopatológicas del tumor, la expresión de receptores en la membrana celular, el grado de diferenciación de las células tumorales, el estadio de crecimiento y diseminación y el perfil genético.

La clasificación más difundida y utilizada por su practicidad en cuanto a pronóstico y decisión de tratamiento combina características histológicas y la expresión de ciertas proteínas para determinar cuatro subtipos de cáncer de mama (Cardoso *et al.*, 2019).

- Luminal A: Tumores usualmente de bajo grado histológico (mayor semejanza con células normales), con expresión de receptores de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP), y sin sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) en membrana; tienen una tasa de proliferación baja.
- Luminal B: Similares a luminal A, con expresión de RE y niveles variables de RP. Tienen una tasa proliferativa más alta que los luminales A, generalmente son de mayor grado histológico y presentan mayor potencial metastásico.
- HER2 +: Tumores que sobreexpresan HER2 en membrana
- Triple negativo: Tumores que no expresan RE ni RP y tampoco sobreexpresan HER2.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa entre el 15% y 20% de los cánceres mamarios. Se caracteriza por ser biológicamente agresivo, de grado histológico moderado a alto (menor semejanza con células normales) con una alta tasa proliferativa. Su comportamiento agresivo implica recidivas más frecuentes y de aparición más temprana respecto de otros subtipos de cáncer de mama, con riesgo de metástasis y muerte dentro de los primeros 5 años posteriores al diagnóstico casi tres veces mayor (Dent *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2016) .

Si bien CMTN agrupa a un conjunto heterogéneo de tumores, su presentación más usual y convencional es el carcinoma ductal invasivo, aunque

hay otros tipos histológicos con características y pronósticos particulares (Geyer *et al.*, 2017; Pareja y Reis-Filho, 2018).

De acuerdo con su expresión génica, los CMTN pueden clasificarse en seis perfiles: tipo basal 1, tipo basal 2, inmunomodulatorio, mesenquimal, mesenquimal tipo *stem* y receptor de andrógenos luminal (Chen *et al.*, 2012).

Los tumores tipo basal 1 sobreexpresan genes relacionados con vías de señalización en respuesta a daño del ADN mientras que los de tipo basal 2 están asociados a regulación positiva de la vía de señalización del factor de crecimiento TP53 junto con la expresión de marcadores mioepiteliales.

Los tumores inmunomodulatorios se caracterizan por señalización inmunológica hiperactiva e infiltración de linfocitos en el tumor.

Los tumores mesenquimales y mesenquimales de tipo *stem* están enriquecidos en expresión de genes relacionados con la transición epitelio mesenquimática diferenciándose por la expresión de genes pluripotenciales en el segundo grupo.

El grupo con receptor de andrógenos se comporta de forma similar al subtipo molecular luminal (Fragomeni *et al.*, 2018; Pareja *et al.*, 2016). Es frecuente la superposición del perfil inmunomodulatorio con los demás perfiles de expresión (Lehmann *et al.*, 2016).

Debido a la ausencia de RP, RE y HER2, resulta inviable aplicar al CMTN las terapias dirigidas a estos receptores por lo que el abanico terapéutico es más limitado en comparación con otros subtipos de cáncer de mama.

Generalmente, se recurre a la resección quirúrgica, cuando posible, combinada con diferentes quimioterapias sistémicas para el tratamiento neoadyuvante (previo a la cirugía) y/o adyuvante (posterior a la cirugía) (Bergin y Loi, 2019).

Los agentes quimioterápicos más utilizados son antraciclinas como la doxorubicina, intercalante de ADN que bloquea a la topoisomerasa II; agentes alquilantes como la ciclofosfamida; taxanos como paclitaxel que interactúan con los microtúbulos impidiendo la mitosis y antimetabolitos como 5-fluorouracilo que afecta la síntesis de ADN. Para pacientes con enfermedad avanzada también se utilizan los antimetabolitos capecitabina y gemcitabina y derivados de platino (Won y Spruck, 2020).

No existe un protocolo de quimioterapia establecido para las pacientes que presentan recidiva o tumores refractarios al tratamiento. Las respuestas al tratamiento en estas pacientes suelen ser de corta duración, seguidas por progreso rápido de la enfermedad. Con tratamiento quimioterápico, el tiempo libre de progresión de estas pacientes con poca respuesta tiene una mediana de 1.7 a 3.7 meses mientras que la supervivencia posterior a la aparición de focos metastásicos es de 10 a 13 meses (Cardoso *et al.*, 2018; Won y Spruck, 2020)

El CMTN usualmente posee gran cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor, siendo más inmunogénico que otros subtipos tumorales (Stanton *et al.*, 2016). Además, la expresión de PDL-1 (ligando de muerte celular programada) en aproximadamente un 20% de los casos (Mittendorf *et al.*, 2014), ha llevado a que la inmunoterapia también sea considerada como una posible opción de tratamiento con anticuerpos monoclonales como atezolizumab y pembrolizumab.

También pueden utilizarse inhibidores de la poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) en aquellos CMTN con un perfil de expresión génica de tipo basal y terapias contra la señalización de factor de crecimiento como los inhibidores de tirosina kinasa lapatinib y gefitinib o el anticuerpo monoclonal cetuximab para el perfil tipo basal 2. Los de perfil mesenquimales tienden a ser susceptibles a la inhibición de mTOR con rapamicina y para los CMTN que expresan receptor de andrógenos pueden utilizarse terapias específicas como el antiandrógeno no

esteroide bicalutamida (Mandapati y Lukong, 2023; Maqbool *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2020).

A pesar de que los tratamientos disponibles reducen la progresión del tumor y, en términos generales, incrementan el índice de supervivencia, un número importante de pacientes presentan una respuesta insuficiente y finalmente, experimentan resistencia al tratamiento y/o el desarrollo de metástasis, lo cual suele ser la principal causa de mortalidad en el cáncer.

La quimiorresistencia es un proceso complejo que involucra la interacción entre el microambiente tumoral, el eflujo de drogas, las células madre tumorales y las células tumorales en general. Este fenómeno está regulado por alteraciones en diversas vías de señalización que afectan estas interacciones.

Entre estas alteraciones se pueden encontrar una mayor capacidad antioxidante relacionada con la mayor concentración basal de especies reactivas de oxígeno (ROS) que suelen tener los CMTN en comparación con otros subtipos (Sarmiento-Salinas *et al.*, 2019); eflujo de drogas por contribución de glicoproteína-P, proteína de resistencia a multidrogas 1, proteína de resistencia de cáncer de mama BCRP y otros transportadores del tipo ABC (*ATP binding cassette*) (Nedeljković y Damjanović, 2019); vías de reparación del ADN potenciadas por expresión de PARP1 y O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa, entre otras.

También son relevantes procesos como la autofagia que permite el reciclado de nutrientes para las células tumorales y la expresión de proteínas anti-apoptóticas, especialmente miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Bai *et al.*, 2021).

Además, la reprogramación metabólica permite a las células tumorales satisfacer sus necesidades energéticas para rápido crecimiento mediante el aumento de la fosforilación oxidativa y la β -oxidación de ácidos grasos además de la glucólisis y es esta plasticidad metabólica la que confiere cierta resistencia

a terapias que apuntan al bloqueo/inhibición de alguna vía energética específica (Jia *et al.*, 2019).

Otro factor clave en la respuesta o resistencia terapéutica es el microambiente tumoral. Compuesto por células estromales, inmunes y sanguíneas en conjunto con la vasculatura, este contribuye a la heterogeneidad tumoral (Bai *et al.*, 2021).

Por último, existe evidencia que indica que la mayoría de los cánceres dependen de una pequeña población de células denominadas *Cancer Stem Cells* (CSC) que permiten el continuo crecimiento y expansión tumoral a través de la autorrenovación ilimitada. Esta propiedad se mantiene a través de la división celular que puede ser simétrica (dos células hijas iguales) o asimétrica (una célula hija con propiedades *stem* y otra diferenciada) (Verga Falzacappa *et al.*, 2012).

1.1.3.3 Resistencia y *Cancer Stem Cells* (CSC)

Varios estudios han demostrado la mayor resistencia de las CSC con respecto a otras células tumorales frente a las terapias antitumorales convencionales, por lo que el tratamiento suele llevar al enriquecimiento del tumor en este tipo celular (Economopoulou *et al.*, 2012). Algunos de los mecanismos de resistencia propuestos para las CSCs son:

- Un alto contenido de moléculas secuestradoras de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que conduce a una acción reducida de estos agentes derivados del oxígeno que generan quiebres en el ADN de doble cadena (Diehn *et al.*, 2009; Lagadec *et al.*, 2012).
- Alteración de puntos de control del ciclo celular con un consiguiente efecto protector contra la radioterapia y quimioterapia (Bartucci *et al.*, 2012).
- Sobreexpresión de transportadores ABC que participan activamente en la eliminación del interior celular de quimioterapéuticos, radio-

sensibilizantes y radiofármacos (Begicevic y Falasca, 2017; Brunner *et al.*, 2012).

- Expresión de enzimas detoxificantes, como la ALDH que protege a las células de ciertos fármacos y que recientemente ha sido asociada a la resistencia a la radioterapia (Croker y Allan, 2012).
- Quiescencia, estado que le confiere a las CSC protección frente a la mayoría de las terapias convencionales ya que estas suelen estar dirigidas a la división celular (Li y Bhatia, 2011).

Estas características y mecanismos tienen implicancia terapéutica por lo que hace ya tiempo se busca desarrollar terapias que logren la erradicación de las CSC.

1.2 Tiosemicarbazonas (TSCs)

1.2.1 Síntesis y características

Las tiosemicarbazonas (TSCs) (Figura 4) son compuestos que se caracterizan por un proceso de síntesis relativamente sencillo. Generalmente se obtienen a partir de la reacción quimioselectiva de aldehídos y/o cetonas con tiosemicarbazidas en medio alcohólico y en presencia de cantidades catalíticas de ácido (Sarodnick *et al.*, 2003; Weinstock y Cheng, 1979). Esta reacción es rápida, de alto rendimiento y bajo costo.

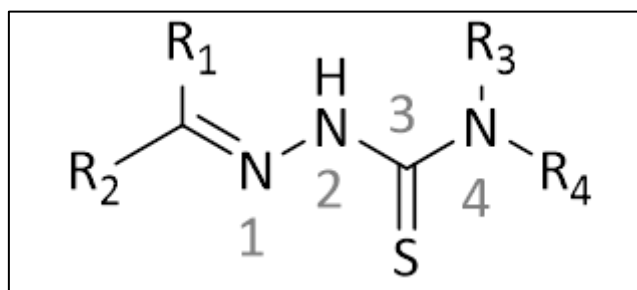


Figura 4. Estructura general de las tiosemicarbazonas con numeración según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Las TSCs no sustituidas en el N^4 presentan una estructura planar con el átomo de azufre en posición *anti* respecto al átomo de nitrógeno de la función imina ($-C=N-$) que posibilita la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el átomo de nitrógeno de la función imina y los átomos de hidrógeno de la función tioamida (Casas *et al.*, 2000). Por otro lado, si la función tiosemicarbazona está sustituida en el N^4 , se favorece la configuración *syn* respecto del átomo de nitrógeno de la imina y el átomo de azufre. Las TSCs pueden existir como forma tiona o tiol en un equilibrio tautomérico (Bharti *et al.*, 2003).

Respecto al aspecto coordinativo, las TSCs pueden actuar como ligandos, tanto neutros (en forma tiona) como monoaniónicos (por pérdida de protón de la forma tiol), pudiendo dar lugar a la formación de complejos neutros, aniónicos o catiónicos. La coordinación que da como resultado un anillo quelato de cinco miembros es la más estable y se forma especialmente con cationes de bajo estado de oxidación como paladio, platino, cobre, hierro y plata (Padhyé y Kauffman, 1985).

1.2.2 Aplicaciones

Las TSCs han despertado interés por sus efectos biológicos desde la década de 1940 cuando se describió la actividad de un compuesto de esta familia frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Domagk *et al.*, 1946). Han sido descritas TSCs con actividad antimicrobiana (D'Agostino *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2018), antiparasitaria (Carvalho y de Melo, 2009; Moreno-Rodríguez *et al.*, 2014), antiinflamatoria (Kanso *et al.*, 2021) y antitumoral (de Siqueira *et al.*, 2019). Estas variadas actividades se atribuyen principalmente a la capacidad de las TSCs de actuar como quelantes al formar complejos con cationes metálicos y al estrés oxidativo debido a la producción de ROS causada por la participación de estos complejos en reacciones de óxido-reducción. Además, algunas TSCs pueden inhibir directamente a la ribonucleótido reductasa, limitando la síntesis de ADN por falta de desoxirribonucleótidos (Kalinowski *et al.*, 2009).

1.2.2.1 TSCs en cáncer y rol de NDRG1

A lo largo de los años, se ha evaluado el efecto antitumoral de varias TSCs, llegando algunas a ensayos clínicos. Entre las primeras TSCs reportadas con actividad antitumoral se encuentra la tiosemicarbazona de la 2-formilpiridina, ensayada contra leucemia en ratones (Brockman *et al.*, 1956). Tomando a esta TSC como base se sintetizaron derivados con diversas sustituciones entre los cuales sobresalió la tiosemicarbazona de 5-hidroxil-2-formilpiridina (5-HP), compuesto que llegó a ensayo clínico de fase I mostrando actividad contra leucemia, pero acompañado de efectos secundarios severos asociados principalmente a toxicidad gastrointestinal (Blanz Jr. y French, 1968; DeConti *et al.*, 1972). Un derivado mejorado de 5-HP es la tiosemicarbazona de 3-aminopiridina-2-carboxaldehído (Triapina) que ha pasado por múltiples ensayos clínicos de fase I y II para tumores sólidos y hematológicos, no demostrando buenos resultados como terapia única (Nutting, 2009; Giles, 2003; Murren, 2003; Knox, 2007; Feun, 2002) pero sí en combinación con otros tratamientos (Kunos *et al.*, 2011; Kunos *et al.*, 2019; Zeidner *et al.*, 2014). Si bien aún se desarrollan ensayos con Triapina, ha sido reportada como efecto secundario la mielosupresión y sus consecuentes neutropenia y trombocitopenia relacionadas con la actividad quelante del compuesto que han llevado a la búsqueda de compuestos más selectivos y con mejor balance lipohidrofílico que permitan obtener efectos similares a menor concentración (Richardson *et al.*, 1995; Whitnall *et al.*, 2006).

Una serie de TSCs más nuevas son las tiosemicarbazonas de 2-piridilcetona (DpT) y entre ellas sobresale N^4 -dimetil tiosemicarbazona de la di-2-piridilcetona (Dp44mT) que ha mostrado actividad antiproliferativa en células de leucemia y cánceres de mama, próstata y pulmón, entre otros (Lovejoy, 2012; Noulisri, 2009; Dixon, 2013; Rao *et al.*, 2009).

N-myc downregulated gene 1 (NDRG1) es una proteína de acción pleiotrópica que ha sido reportada como supresor metastásico en distintos tipos

de cáncer (Bandyopadhyay *et al.*, 2003, 2004; Guan *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2005). Posee numerosos efectos biológicos entre los que se encuentran la regulación de angiogénesis, diferenciación, invasión y apoptosis, todos aspectos relacionados con el proceso metastásico (Kovacevic y Richardson, 2006).

Asimismo, se ha observado que las TSCs Dp44mT y DpT no sólo regulan la expresión de NDRG1 (Kovacevic *et al.*, 2011) sino que la acción antimetastásica de Dp44mT es dependiente de esta proteína (Liu *et al.*, 2012).

Uno de los factores en la regulación de la expresión de NDRG1 es la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia HIF-1 (Cangul, 2004). Cuando los niveles de oxígeno celulares son normales, enzimas del tipo prolil hidroxilasa dependientes de oxígeno actúan sobre la subunidad α de HIF-1, iniciando la señalización para su degradación. Al disminuir la disponibilidad de oxígeno la actividad de las prolil hidroxilasas es inhibida, la subunidad α de HIF-1 heterodimeriza con la subunidad β para formar el complejo HIF-1 que se transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE en inglés) en el ADN para inducir expresión de genes como NDRG1 que posee dos HRE río arriba de su región promotora (Le y Richardson, 2004). Además de oxígeno, las prolil hidroxilasas requieren hierro como cofactor por lo que la depleción de hierro celular genera un estado similar al de hipoxia (Cangul, 2004). También posee regulación independiente de HIF-1 durante la hipoxia asociada a la acción de los factores de transcripción Egr-1 y AP-1 (Salnikow *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007).

Numerosos estudios han demostrado el efecto supresor de NDRG1 sobre el crecimiento tumoral la angiogénesis y la metástasis, relacionando a esta proteína con múltiples vías de señalización entre las que se encuentran TGF- β , Wnt- β -catenina, NF κ B, PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK/ERK y *Sonic Hedgehog* (Chekmarev *et al.*, 2021).

1.2.3 TSCs N^4 aril sustituidas derivadas de 1-indanonas

El núcleo de 1-indanona es una estructura relevante en la química medicinal, asociada con varios compuestos farmacológicamente activos (Patil *et al.*, 2017). Con actividad biológica variada, las 1-indanonas están presentes en compuestos tanto sintéticos como naturales conocidos por sus efectos antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiana y antitumoral, entre otros (Turek *et al.*, 2017).

Teniendo esta información en cuenta, diversos grupos de investigación se han enfocado en el desarrollo de compuestos combinando 1-indanonas con tiosemicarbazidas para obtener TSCs (Kuran *et al.*, 2023; Urooj Nazim *et al.*, 2021). En el Laboratorio de Química Medicinal perteneciente al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, la Dra. Liliana Finkielstein y sus colaboradores han desarrollado la síntesis de TSCs derivadas de 1-indanonas con diversos sustituyentes en el anillo aromático del núcleo indánico. Diferentes compuestos de esta biblioteca han demostrado tener actividad antiviral contra el virus de la diarrea viral bovina (Finkielstein *et al.*, 2008), antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* (Caputto *et al.*, 2011) y antileucémica al estar complejados con platino y paladio (Gómez *et al.*, 2011). Sin embargo, una desventaja de estas TSCs es su baja solubilidad, tanto en medios acuosos como orgánicos (Glisoni *et al.*, 2010) por lo que se sintetizaron TSCs con sustituciones arílicas en el N^4 de la función tiosemicarbazona (N^4 -TSCs) con el objetivo de mejorar el balance lipohidrofílico, aumentando su capacidad de difundir a través de membranas biológicas (Chattopadhyay *et al.*, 1989). Esta síntesis se realizó a partir de 1-indanonas con diferente sustitución en el anillo aromático, hidrato de hidrazina y los correspondientes isotiocianatos en presencia de ácido acético e isopropanol utilizando la metodología de síntesis en microondas (Caputto *et al.*, 2011).

La acción antitumoral de tres N^4 -TSCs sintetizadas por esta metodología (T1, T2 y T3) fue evaluada *in vitro* en líneas de cáncer de mama humano con

diversa expresión de receptores: MDA-MB-231 (RE-/RP-/HER2-), MCF7 (RE+/RP+/HER2-) y BT-474 (RE-/RP-/HER2+). Dos de ellas, T1 y T2, mostraron efecto citotóxico en concentraciones micromolares sin afectar la línea derivada de tejido mamario no tumoral MCF10-A. Parte de este efecto se adjudicó a la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa y a la acumulación de ROS, siendo T2 el compuesto más potente de los dos. También se vieron afectadas las capacidades clonogénica y migratoria de las células, así como el crecimiento en condición de *anoikis* relacionado con el estado de las células *stem* (Sólino *et al.*, 2018).

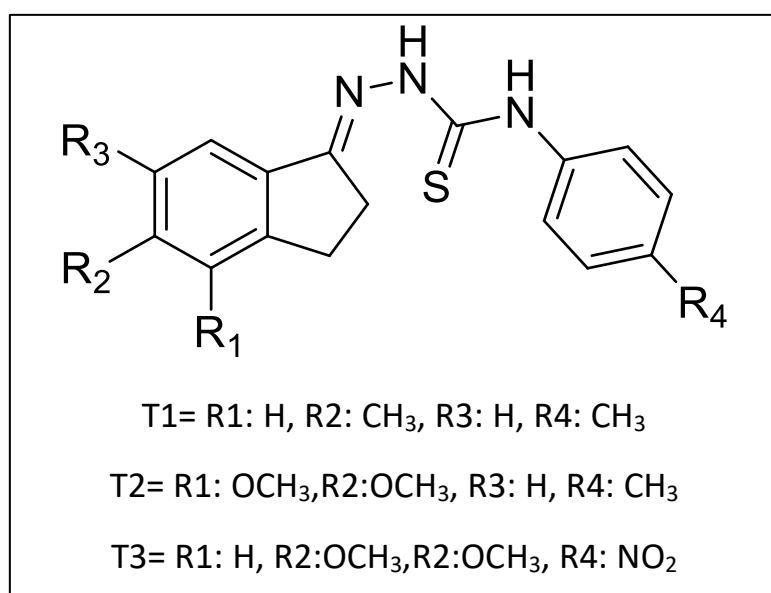


Figura 5. Estructura general de las *N*⁴-TSCs. Sustituciones correspondientes a T1, T2 y T3.

A large, stylized number '2' in a light purple color, positioned on the left side of the slide. It has a thick, rounded stroke and a small gap in the middle of the vertical bar.

Hipótesis de Trabajo y Objetivos

Hipótesis:

T2, una tiosemicarbazona N^4 -aril sustituida sintetizada en un laboratorio de nuestro país, posee un efecto antitumoral y antimetastásico sobre el modelo murino de adenocarcinoma mamario triple negativo 4T1, ejerciendo su efecto tanto sobre las células tumorales como también sobre el componente *stem* del tumor.

Objetivos:

1. Estudiar *in vitro* el efecto de T2 sobre las células 4T1, derivadas de un tumor mamario murino triple negativo, cultivadas en monocapa. Determinar su acción sobre las principales características asociadas al comportamiento tumoral maligno de estas células como crecimiento, clonogenicidad, migración e invasión.
2. Analizar el efecto de T2 sobre la población de *Cancer Stem Cells*.
3. Estudiar las posibles vías de señalización a través de las cuales T2 ejerce sus efectos.
4. Estudiar *in vivo* la acción de T2 sobre el crecimiento del tumor mamario originado por células 4T1 y su capacidad de diseminación en ratones BALB/c empleando los modelos subcutáneo e intraductal.

3

Materialles y Métodos

3.1 T2

La N^4 -(*p*-metil)fenil tiosemicarbazona de la 4,5-dimetoxi-1-indanona (T2, Figura 6) (Sólino *et al.*, 2018) fue sintetizada y provista por el grupo dirigido por la Dra. Liliana Finkielstein perteneciente al Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Para los experimentos *in vitro* fue preparado un *stock* 50 mM disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO).

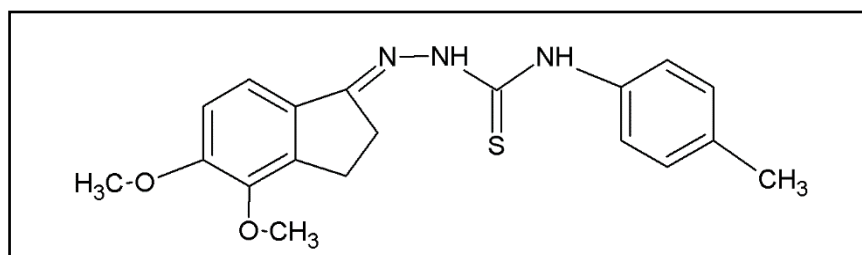


Figura 6. Estructura de la N^4 -(*p*-metil)fenil tiosemicarbazona de la 4,5-dimetoxi-1-indanona (T2).

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Líneas celulares

Las líneas de adenocarcinoma mamario murino triple negativo 4T1 y de carcinoma ductal humano triple negativo HCC70, obtenidas de ATCC, fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%.

La línea LM-38 LP, originalmente aislada a partir de un adenocarcinoma mamario papilar triple negativo surgido espontáneamente en un ratón BALB/c en el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (Bumaschny *et al.*, 2004), fue cultivada en DMEM-F12 suplementado con SFB al 10%.

Todas las líneas fueron mantenidas en frascos de 25cm² (T25) en estufa gaseada con 5% CO₂ y a 37°C. Fueron realizados controles periódicos de contaminación con micoplasma a través de tinciones con DAPI y por PCR.

3.2.2 Citotoxicidad

Las células 4T1, HCC70 y LM38-LP cultivadas en frascos T25 fueron removidas con tripsina, sembradas en placa de 96 pocillos con densidad de 1000 células por pocillo y cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. Luego de 48 horas, las células fueron tratadas con T2 en medio RPMI suplementado con 2% SFB, en concentraciones de 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 25 µM y 50 µM, utilizándose como control DMSO 0.1% (equivalente a la concentración de DMSO utilizada para obtener la mayor concentración de tratamiento con T2). Tras 120 horas de tratamiento la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTS (Cory *et al.*, 1991). Para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀ del inglés half-maximal *inhibitory concentration*), fue realizado un análisis de regresión no lineal de la curva de densidad óptica (490/620 nm) en función del logaritmo de la concentración de T2 utilizando el programa *PrismGraph*.

3.2.3 Formación de colonias

Células 4T1 fueron tratadas por 24 horas con T2 en concentraciones 2.5, 5 y 10 µM, utilizando DMSO 0.02% como control. Posteriormente, fueron removidas con tripsina, contadas en cámara de Neubauer con azul tripán y sembradas en placas de 6 pocillos (1000 células/pocillo). Tras 7 a 10 días de incubación las placas fueron lavadas con *buffer* fosfato salino (PBS), fijadas con metanol:ácido acético (3:1) por 10 minutos y teñidas con cristal violeta 0.5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Fue determinado como criterio de inclusión de una colonia que ésta estuviera compuesta por al menos 15 células.

3.2.4 Cuantificación de apoptosis

Células 4T1 tratadas por 24 horas con T2 (2.5, 5 y 10 µM) o DMSO 0.02% como control fueron tripsinizadas y teñidas con anexina V acoplada a FITC y yoduro de propidio 50 µg/ml por 30 minutos (RyD Systems) para detectar

presencia de células apoptóticas y necróticas mediante citometría de flujo. Para ello fueron utilizados un citómetro FACS-Calibur BD y el programa *Cyfllogic* versión 1.2.1 para el análisis de resultados.

3.2.5 Ensayo de migración

La capacidad migratoria de las células fue evaluada mediante el ensayo de cierre de herida. Células 4T1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos e incubadas hasta una confluencia de entre 70% y 80%. Estas monocapas fueron tratadas con DMSO 0.02% o T2 2.5, 5 y 10 μ M. Tras 24 horas de tratamiento, el medio fue removido y dos heridas fueron realizadas en cada pocillo en forma de líneas paralelas con la ayuda de un *tip*. Las células fueron cultivadas en RPMI-2% SFB durante 17 horas a 37C y 5% CO₂. Las heridas fueron fotografiadas con microscopio de contraste de fases al momento inicial ($T_{inicial}$) y después de las 17 horas de incubación (T_{final}). El área de las heridas en $T_{inicial}$ y T_{final} fue medida con el programa *ImageJ* y el porcentaje de cierre de la herida fue calculado como:

$$\% \text{ cierre} = 100 * \frac{\text{área final} - \text{área inicial}}{\text{área inicial}}$$

Cuatro campos fueron considerados por pocillo.

3.2.6 Zimografía

Para evaluar la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 fueron realizados ensayos de zimografía (Tajhya *et al.*, 2017). Células 4T1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos e incubadas por 48 horas con RPMI 10% SFB. Luego fueron tratadas con DMSO 0.02% o T2 2.5, 5 o 10 μ M. Después de 24 horas de tratamiento, el medio con la TSC fue retirado y reemplazado por RPMI sin suero durante 16 horas para obtener el medio condicionado. Una vez recolectados los medios condicionados, las proteínas celulares fueron extraídas utilizando *buffer* RIPA con EDTA en presencia de inhibidores de proteasas. La

concentración de proteínas presentes en las muestras fue evaluada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Por otro lado, la electroforesis de los medios condicionados fue realizada en geles de poliacrilamida 10% preparados con 0.1% de gelatina porcina. Luego de la electroforesis, los geles fueron incubados dos veces por 10 minutos en una solución 2.5% Tritón X-100 y, posteriormente, en el *buffer* de activación de MMPs (50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, 0.02% Tritón X-100) *overnight* a 37°C. Los geles fueron lavados con agua, teñidos con 0.5% *Coomassie Blue* R250 y desteñidos con una solución de metanol, ácido acético y agua (en proporciones 4:1:5). Finalmente, la degradación de gelatina fue medida por densitometría, utilizando el programa *ImageJ* para cuantificar el área desteñida. La actividad gelatinasa fue determinada como el cociente entre el área desteñida y la cantidad de proteínas totales de cada muestra.

3.2.7 Ensayo de invasión *transwell*

Células 4T1 tratadas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μM) fueron tripsinizadas y sembradas en cámaras *transwell* con poros de 8 micrones cubiertas con *Matrigel*® (Hughes *et al.*, 2010). Medio con 10% de SFB fue utilizado como quimioattractante. Al cabo de 5 horas, las membranas fueron fijadas con formol, teñidas con DAPI y observadas en microscopio de fluorescencia con aumento de 40x. Finalmente, fueron contadas las células presentes en el lado inferior de la membrana en ocho campos por membrana.

3.2.8 Formación y tratamiento de mamóferas

Para evaluar el efecto de T2 sobre la formación de esferas células 4T1 tratadas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μM) fueron removidas con tripsina y cultivadas en suspensión en placas de 6 pocillos recubiertas con agar 1.5% (agar 3% preparado en agua, disuelto al medio con RPMI), en medio RPMI

suplementado con Gem21 NeuroPlex (GiminiBio) y EGF (BioLegend, 10 ng/ml). Posteriormente, 1500 células viables fueron sembradas por pocillo y, después de 5 a 8 días de cultivo, las esferas formadas fueron fijadas con formol, contadas y fotografiadas con un microscopio invertido de contraste de fase *Nikon ECLIPSE TE2000-S*. Para contar las esferas, se estipuló como criterio de inclusión que tuvieran un diámetro mínimo de 50 μm que fue medido con el programa *ImageJ*.

Para evaluar el efecto de T2 sobre mamosferas ya formadas, 1500 células 4T1 fueron sembradas por pocillo en placas de 6 pocillos en las condiciones de formación de esferas previamente descritas. Al cabo de 5 a 8 días, cuando ya se contaba con mamosferas de al menos 50 μm , las mismas fueron recolectadas, centrifugadas a 300G por 5 minutos y resuspendidas en medio RPMI suplementado con EGF y Gem21 al que fue agregado el tratamiento correspondiente (DMSO, T2 2.5, 5 o 10 μM). Tras 48 horas de tratamiento las esferas fueron fijadas con formol, contadas y fotografiadas. Sus diámetros fueron medidos con el programa *ImageJ*.

3.2.9 Citometría para determinación de la subpoblación *stem*

Células 4T1 tratadas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μM) por 24 horas fueron tripsinizadas, centrifugadas, resuspendidas en PBS, incubadas con anticuerpos anti- CD24-APC (1/300), anti-CD29-FITC (1/100) y anti-LIN-PE (*Mouse Lineage Cocktail*, 1/7) todos de BioLegend. Posteriormente, fueron evaluadas en citómetro de flujo PASIII (PARTEC). Se utilizó el programa *FlowJo* para analizar los datos obtenidos.

3.2.10 qRT-PCR y *Stem loop* PCR

Para extraer ARN de células 4T1 tratadas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μM) por 24 horas fue utilizado BIO-ZOL (Productos Bio-Lógicos) según instrucciones del proveedor. La cuantificación de la concentración de ADN

(absorbancia a 260 nm) y de su calidad (relación de absorbancias 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm) de la muestra fueron obtenidas mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Para la retrotranscripción con la enzima M-MLV Transcripta (Productos Bio-Lógicos) fueron usados 2 µg de ARN y 2 µl de hexámeros al azar siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de los genes pluripotenciales Nanog, Oct-4, Sox-2, NDRG1 y el control interno GAPDH (*primers* detallados en la Tabla 1) fue determinada mediante real time PCR utilizando el kit *TransStar Green* en un termociclador C1000 (Biorad). El programa para Nanog, Oct-4 y Sox-2 consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 94°C, 60°C y 72°C por 30 segundos con detección de la fluorescencia en cada ciclo al final de la elongación. Para evaluar la expresión de NDRG1 fue utilizado un programa similar con una temperatura de apareamiento de 56°C. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado y fueron incluidos controles de ARN sometidos al protocolo de retrotranscripción sin retrotranscriptasa. Los resultados obtenidos fueron normalizados según la expresión de GAPDH y fue utilizado el método $\Delta\Delta C_t$ para calcular los cambios en la expresión del RNA.

Para evaluar la expresión de genes asociados al proceso de transición epitelio-mesenquimática y a la vía de Wnt- β -catenina, fue realizada la extracción de ARN de células 4T1 previamente tratadas durante 24 horas con DMSO 0.02% o T2 5 µM en combinación con LiCl 10 mM (inductor de TEM y Wnt) o NaCl 10 mM. Los genes evaluados fueron Axina2, CD44, c-Myc, TCF-7, Snail, Twist y Vimentina; utilizando HPRT como control para normalizar (*primers* detallados en Tabla 1), siguiendo el protocolo de PCR descrito anteriormente.

Por otro lado, fue realizada qPCR para los microRNA miR-182 y miR-200c y el ARN nuclear pequeño U6 como control de carga con *primers* diseñados según la técnica de *Stem Loop* PCR (Yang *et al.*, 2014) (*primers* detallados en la Tabla 2). La retrotranscripción fue realizada de la forma ya descrita, reemplazando los

hexámeros al azar con 1 μ M de cada *stem loop primer*. Para la qPCR fueron utilizados *primers* directos específicos para cada miRNA y un *primer* reverso universal complementario a la secuencia del *stem loop*. La corrida consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 55.2°C por 30 segundos, 72°C por 10 segundos y 79.5°C por 5 segundos con medición de fluorescencia al final de cada elongación.

Blanco	<i>Primer Directo</i>	<i>Primer Reverso</i>
NDRG1	ATGTCCCGAGAGCTACATGAC	CCTGCTCCTGAACATCGAACT
Nanog	CCTTCCCTCGCCATCACACTGACA	GAGGAAGGGCGAGGAGAGGCAGC
Oct-4	GACCGCCCCAATGCCGTGAA	ACCTTTCAAAGAGAACGCCAGG
Sox-2	CAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAGAG	GCCGCCGCGATTGTTGTGAT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
Axina2	TGACTCTCCTTCCAGATCCCA	TGCCCACACTAGGCTGACA
CD44	GAATGTAACCTGCCGCTAC	GGAGGTGTTGGACGTGAC
c-Myc	GATGAAATAGGGCTGTACGGAG	GCTGTTTGAAGGCTGGATTTC
TCF-7	CCCCACAGAGAACTGAAGC	ATCAGGCTCTTCCCAGTTCC
Snail	GTCTGCACGACCTGTGAAAA	GGTCAGCAAAAGCACGGTTG
Twist	AAGAGGTCTTGCCAATCAGC	TTTGCAGGCCAGTTTGATCC
Vimentina	CGGCTGCGAGAGAAATTGC	C ACTTTCCGTTCAAGGTCAAG
HPRT	CTGGTGAAAAGGACCTCTCG	TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados para PCR en tiempo real.

Blanco	<i>Stem Loop Primer</i>	<i>Primer</i>
miR-182	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGAACCGGTGT	GGGTTTGGCAATGGTAGAAGGT
miR-200c-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCCACTGGATACGACCCAAAC	CCCCGTCTTACCCAGCAG
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACAAAAAT	CCCAAGGATGACACGCA
Reverso Universal	-	GTGCAGGGTCCGAGGT

Tabla 2. Secuencias de los *primers* utilizados para *stem loop* PCR.

3.2.11 Western Blot

Células 4T1 fueron tratadas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μ M) por 24 horas, lavadas con PBS frío y lisadas en *buffer* RIPA con EDTA en presencia de

inhibidores de proteasas y fosfatasa (Abcam). La concentración de proteínas presentes en las muestras fue evaluada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la corrida electroforética, las muestras fueron calentadas a 100°C por 5 minutos en *buffer* Laemmli (Tris base 0.0625M, SDS 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol) con 10% β -mercaptoetanol. Fueron utilizados geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de porcentaje variado de acuerdo con el peso de las proteínas en estudio y las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF. Para bloquear uniones no específicas, las membranas fueron bloqueadas con Tris (TBS) con 5% de leche descremada. Posteriormente, fueron incubadas *overnight* a 4°C con los anticuerpos específicos para NDRG1 (Santa Cruz, sc-398291, 1:1000), E-cadherina (Abcam, #ab76055, 1:1000), Caspasa 3 (*Cell Signaling* #9662S 1:1000), PARP1 (*Cell Signaling* #9532S, 1:1000), Bcl-XI (Abcam #ab32370, 1:1000), β -catenina (*Cell Signaling* #8480, 1:1000) o ZEB1/TCF8 (*Cell Signaling* #3396, 1:250). Seguidamente, fueron incubadas una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP (*Novus Biologicals* HAF007 y HAF008, 1:500). Finalmente, las proteínas fueron detectadas utilizando el sistema de quimioluminiscencia aumentada (Mruk y Cheng, 2011) con un lector ImageQuant LAS 500. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa *ImageJ*. Para el control de carga fue evaluada sobre las mismas membranas la presencia de β -actina (*Cell Signalling* #3700, 1:1000), β -tubulina (*Cell Signalling* #2146, 1:1000) o GAPDH (*Novus Biologicals* NB300-327, 1:1000).

3.2.12 Inmunofluorescencia

Células 4T1 fueron sembradas y cultivadas en portaobjetos. Luego de ser tratadas durante 24 horas con DMSO 0.02% o T2 (2.5, 5 o 10 μ M), las células fueron fijadas con formol 4% en PBS a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente fueron permeabilizadas y bloqueadas en una solución de PBS con 5% SFB y 0.3% Tritón X-100 por 90 minutos a 37°C, incubadas *overnight* con el

anticuerpo primario contra actina de músculo liso (Sigma #120M468, 1:500) y durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a Alexa 488 (Abcam ab150113, 1:500). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio.

También se utilizó faloidina acoplada a FITC (Sigma-Aldrich, 1:400) incubada durante 45 minutos a temperatura ambiente, marcando los núcleos con DAPI.

Los portaobjetos fueron montados con Mowiol (Calbiochem). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio *Olympus Fluo View FV 1000* y procesadas con *ImageJ*. Para evaluar la distribución de las fibras de actina en las muestras teñidas con faloidina, fue graficada la intensidad de fluorescencia de la actina marcada a lo largo de una línea trazada de forma transversal a células individuales pasando por el núcleo.

3.2.13 Transfección con plásmido reportero

La transfección fue realizada con el agente de transfección FUGENE HD (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Fueron utilizados el plásmido *M50 Super 8x TOPFlash* (Addgene plasmido # 12456) (Veeman *et al.*, 2003) y el plásmido control *Renilla*-luciferasa (pRL-CMV, Promega) en relación 20:1. Luego de 24 horas, el medio de transfección fue reemplazado por medio RPMI con el tratamiento adecuado durante 24 horas. Las células fueron tratadas con T2 (IC₅₀) usando DMSO como control en combinación con TGF- β 3 ng/ml como inductor de la vía de señalización de Wnt.

Finalizado el tratamiento la actividad luciferasa fue evaluada con el *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega).

3.3 Experimentos *in vivo*

3.3.1 Animales

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones BALB/c hembra de entre 12 y 16 semanas de edad con peso entre 20 y 25 gramos provistos y alojados por el Bioterio del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Todos los protocolos experimentales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Roffo (protocolo aprobado número 2017/01).

3.3.2 Dosis Máxima Tolerada

Luego de revisar la bibliografía existente para determinar las dosis iniciales de tiosemicarbazona a ensayar (Whitnall *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2004), Se estableció como esquema de tratamiento la inoculación de cinco dosis de T2 5, 25 y 50 mg/kg administradas día por medio de forma intraperitoneal. Como vehículo fue utilizada una mezcla formada por 30% propilenglicol y 17% DMSO en solución salina (0.9% NaCl). Como controles fueron usados solución salina y el vehículo. La dosis máxima tolerada (DMT) fue establecida como aquella que causó la muerte de menos del 30% de los animales o que llevó a que al menos el 30% de los animales perdieran más del 10% de su peso corporal.

Los ratones fueron monitoreados diariamente y pesados cada tres días. Un mes después del tratamiento, fueron sacrificados con obtención de muestras de sangre por extracción retroorbital para medir concentración de urea y transaminasa glutámico oxalacética. Estos datos fueron obtenidos en el laboratorio de análisis clínicos del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

Patólogos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, especializados en ratones, realizaron el análisis histopatológico de pulmones, riñones e hígado.

3.3.3 Metástasis experimentales

Células 4T1 fueron tratadas con T2 2.5, 5 o 10 μ M o DMSO 0.02% por 24 horas, removidas con tripsina y resuspendidas en medio RPMI libre de suero. Tras dos horas de recuperación, 40000 células viables contenidas en 100 μ l fueron inoculadas de forma intravenosa en la vena lateral de la cola en ratones BALB/c. Luego de tres semanas, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron fijados en solución de Bouin para contar y fotografiar los nódulos metastásicos bajo un microscopio estereoscópico.

3.3.4 Crecimiento tumoral subcutáneo y metástasis espontáneas

Se inocularon 35000 células 4T1 de forma subcutánea y al cabo de una semana se inició el tratamiento con T2 5 o 25 mg/kg o vehículo de acuerdo al mismo esquema utilizado para evaluar DMT, empleando seis ratones por tratamiento en cada experimento. El tamaño de los tumores fue medido con calibre cada 2 o 3 días. Los animales fueron sacrificados tras 4 semanas y los tumores fueron extraídos, pesados y fijados en formol. Los pulmones fueron fijados en solución de Bouin. Los nódulos metastásicos fueron contados y fotografiados bajo un microscopio estereoscópico.

3.3.5 Análisis histopatológico de tumores

Los tumores extraídos de los ratones fueron fijados por 24 horas en una solución de formol al 10%. Posteriormente, fueron deshidratados con pasajes por etanol en concentraciones crecientes y xilol para su posterior inclusión en parafina. Se cortaron secciones de 5 μ m de espesor que luego fueron teñidas con hematoxilina y eosina o con Tricrómico de Masson. Las figuras mitóticas fueron contadas en microscopio con magnificación 400x. El análisis histopatológico fue realizado por patólogos externos acreditados.

3.3.6 Crecimiento tumoral intraductal y *whole mount*

Para optimizar el modelo 4T1 intraductal, ratones BALB/c fueron anestesiados con una mezcla de xilacina y ketamina administrada intraperitonealmente. El pelo de la zona abdominal fue removido con crema depilatoria. Se realizaron pequeñas incisiones en las puntas de los pezones correspondientes a las cuartas mamas en las que fueron inoculados 2 μ l de una suspensión conteniendo 15000 o 35000 células 4T1 en PBS.

Transcurridas hasta dos semanas, los ratones fueron sacrificados. Las glándulas mamarias fueron extraídas, colocadas sobre porta objetos y luego en una solución fijadora de metanol:cloroformo:ácido acético 6:3:1 *overnight*. Tras realizar pasajes por etanol 70% v/v por 15 minutos y agua por 5 minutos, las muestras fueron incubadas con una solución de carmín 0.2% m/v y $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 0.5% m/v en agua por 1-2 días. Posteriormente, fueron lavadas con agua y deshidratadas con etanol 70% por 15 minutos, etanol 95% por 15 minutos, etanol 100% por 15 minutos y xilol por 45 minutos. Las glándulas teñidas fueron observadas bajo lupa estereoscópica y fotografiadas. Finalmente, las glándulas fueron removidas del portaobjetos con bisturí e incluidas en parafina.

Tras la realización de la puesta a punto, se procedió con inoculaciones de 15000 células por mama a tiempo final de 14 días. El tratamiento con T2 25 mg/kg o vehículo (30% propilenglicol, 17% DMSO en solución salina) fue iniciado 48 horas después de la inoculación intraductal y consistió en cinco dosis intraperitoneales administradas día por medio.

3.3.7 Inmunofluorescencia de tejido

Las mamas incluidas en parafina fueron cortadas con micrótomos por personal perteneciente al Servicio de Patología del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Estos cortes luego fueron desparafinados con dos baños de xilol, dos de

etanol 100%, uno de etanol 95%, uno de etanol 70%, uno de agua y uno de PBS de 5 minutos cada uno. El desenmascaramiento de antígenos fue realizado con *buffer* de citrato de sodio 0.1M y ácido cítrico 0.1M (pH=6.0) caliente por 12 minutos, enfriando las muestras inmediatamente en hielo por 10 minutos y lavando con PBS.

Posteriormente, los cortes fueron permeabilizados con dos incubaciones de tritón 0.4% y SFB 1% en PBS por 10 minutos y bloqueados con SFB 5% por 1 hora. Las muestras fueron incubadas *overnight* a 4°C con cada anticuerpo primario diluido en PBS 1% SFB. Tras tres lavados con PBS fueron incubados con el anticuerpo secundario Alexa488 *anti-mouse* (Abcam ab150113, 1/500) y/o Alexa569 *anti-rabbit* (Abcam ab175471, 1/500) durante dos horas. Luego, fueron lavados con PBS y se tiñeron con DAPI por 30 minutos. Los portaobjetos fueron montados con *Mowiol* (Calbiochem). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio *Nikon ECLIPSE E400* y procesadas con *ImageJ*.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: actina de músculo liso (Sigma #120M468, 1:500), pan-citoqueratina (Abcam ab215838, 1:100), CD4 (Abcam ab183685, 1:1000), CD8 (Abcam ab93278, 1:2000), PCNA (*Cell Signaling* cs-2586S, 1/1000), vimentina (Abcam ab92547, 1/500), β -catenina (*Cell Signaling* cs-8480, 1/100).

3.4 Análisis estadístico

Las diferencias entre medias de dos grupos fueron analizadas mediante la prueba t de Student, utilizando la corrección de Welch para muestras con varianzas significativamente diferentes. Las diferencias entre más de dos grupos fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por comparación de Tukey o Kruskal-Wallis con comparaciones de Dunn para análisis no paramétrico. Se utilizó el programa *GraphPad Prism 5.0*, Graph Pad Software, Inc. San Diego California, USA, considerando significativas las diferencias con $p < 0.05$.

4

Resultados

4.1 Efecto citotóxico de T2

Para evaluar la citotoxicidad ejercida por T2 se realizaron ensayos de proliferación celular sobre tres líneas de cáncer de mama triple negativo, HCC70 de origen humano y 4T1 y LM-38 LP de origen murino.

Las células fueron tratadas con T2 en concentraciones entre 0 y 50 μM durante 5 días. Se utilizó un ensayo con la sal de tetrazolio MTS que es metabolizada por las mitocondrias de las células viables dando un producto coloreado que puede medirse por espectrofotometría. Como se observa en la Figura 7, las tres líneas celulares tuvieron una curva de dosis-respuesta similar, siendo los valores de IC_{50} $6 \pm 1 \mu\text{M}$ para la línea 4T1, $3 \pm 1 \mu\text{M}$ para la línea LM-38 LP y $3.5 \pm 1 \mu\text{M}$ para la línea HCC70.

A partir de estos resultados, se eligió trabajar *in vitro* con tres concentraciones de T2: 2.5, 5 y 10 μM para abarcar el IC_{50} , una concentración menor y una concentración mayor de la TSC. Además, para poder evaluar qué procesos se ven afectados antes de la muerte celular, se redujo el tiempo de tratamiento a 24 o 48 horas según lo permitiera el protocolo de cada experimento.

Considerando que la línea 4T1 es ampliamente utilizada como modelo murino de cáncer de mama triple negativo mientras que la línea LM-38 LP no se encuentra totalmente caracterizada y contiene dos subpoblaciones, una luminal y otra mioepitelial (Bumaschny *et al.*, 2004), que agregan un nivel de complejidad a su estudio, se decidió seguir experimentando con la línea 4T1 que permite trabajar *in vivo* con ratones inmunocompetentes.

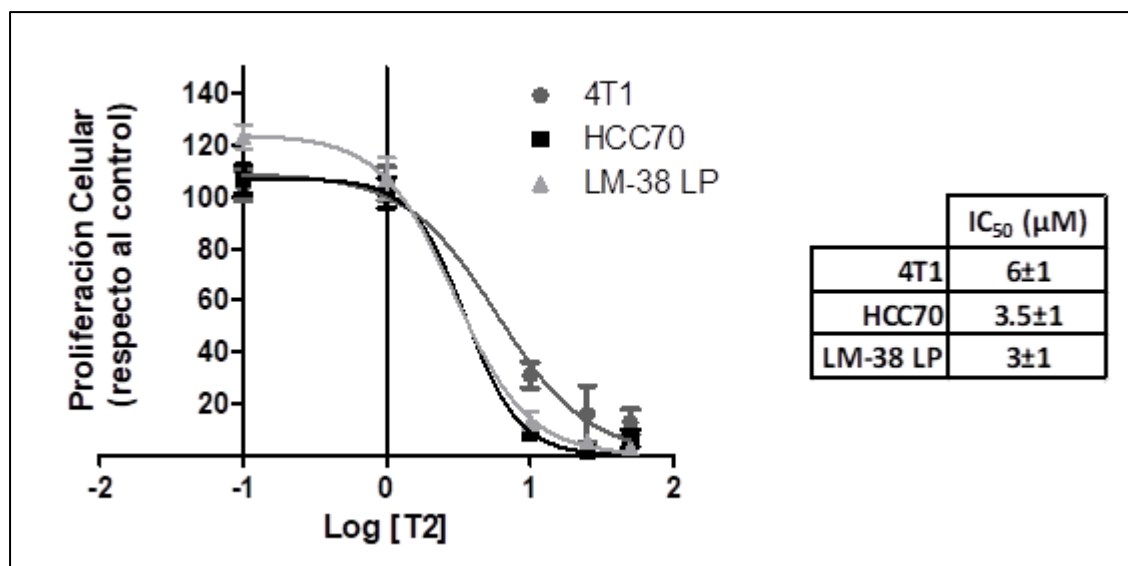


Figura 7. T2 ejerce efecto citotóxico sobre las líneas de cáncer de mama TN 4T1, HCC70 y LM-38 LP. Curvas de proliferación celular en función del logaritmo de la concentración de T2 para las líneas 4T1, LM-38 LP y HCC70. Las células fueron tratadas con T2 o DMSO por 5 días y se evaluó la proliferación celular mediante MTS. Los datos mostrados representan el promedio con su error estándar de tres réplicas independientes.

4.2 T2 induce muerte celular por apoptosis en la línea 4T1

Después de observar el marcado efecto citotóxico de T2, se procedió a determinar el tipo de muerte causado por este compuesto. Mediante la técnica de citometría de flujo de células teñidas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, se detectó que las tres concentraciones ensayadas de T2 causaron un aumento significativo ($p < 0.05$) de la cantidad de células en apoptosis tanto temprana como tardía en la línea celular 4T1 (Figura 8A).

También se evaluó por *Western Blot* la presencia de proteínas asociadas al proceso apoptótico en lisados obtenidos tras el tratamiento de las células 4T1 con T2. Como puede observarse en la Figura 8B, se encontró que las tres concentraciones de T2 llevaron a un incremento significativo ($p < 0.05$) del clivaje de caspasa-3 y PARP1, así como a una reducción en la expresión de Bcl-XL.

La caspasa-3 es un efector de la apoptosis que se traduce como un zimógeno el cual se activa al ser clivado, resultando en un fragmento llamado p17, mientras que Bcl-XL es un inhibidor de la activación de caspasas y PARP1 es

blanco de clivaje por parte de varias caspasas, entre ellas caspasa-3 (Elmore, 2016).

En conjunto, estos resultados mostraron que el tratamiento con T2 induce la activación de la muerte celular por apoptosis.

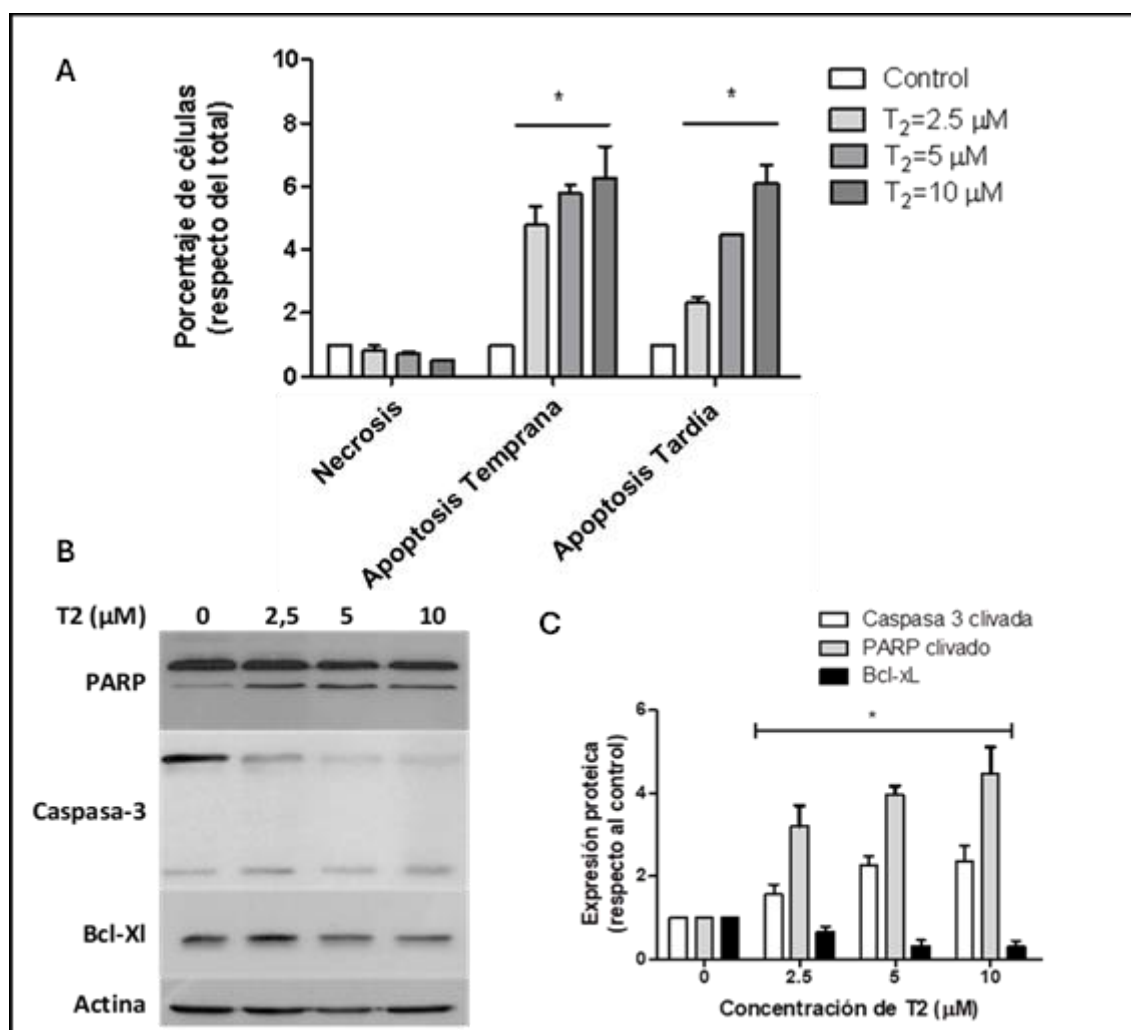


Figura 8. T2 induce apoptosis en las células 4T1. **A:** Análisis por citometría de flujo de células apoptóticas y necróticas teñidas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio tras 24 horas de tratamiento con T2 (2.5, 5 y 10 μM) o DMSO (control). Los resultados se expresan como la media y el error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$. **B:** *Western Blot* ilustrativo de clivaje de PARP, activación de caspasa-3 y disminución de Bcl-xL luego de 24 horas de tratamiento con T2 (2.5, 5 y 10 μM) o DMSO (control). **C:** Análisis densitométrico de los *Western Blots* realizados. Los resultados se expresan como la media y el error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$.

4.3 T2 disminuye la capacidad clonogénica de las células 4T1

Uno de los aspectos característicos de las células tumorales es su exacerbada capacidad reproductiva o clonogénica, lo que le permite su mantenimiento y/o crecimiento sostenido. Al abordar el tratamiento del cáncer, esta capacidad cobra importancia no sólo con respecto al crecimiento del tumor, sino que también es fundamental para el desarrollo de los procesos de recidiva y metástasis donde el tumor vuelve a crecer a partir de unas pocas células residuales en su sitio original o en un órgano distante respectivamente.

Para evaluar el efecto del tratamiento con T2 sobre la capacidad reproductiva de las células 4T1 se realizó un ensayo clonogénico, sembrando las células tratadas con este compuesto en muy baja densidad de forma tal que cada colonia fuera atribuida a una única célula original con capacidad reproductiva. Como puede observarse en la Figura 9, el tratamiento con las tres concentraciones ensayadas de T2 resultó en un número significativamente menor de colonias formadas, es decir, T2 disminuyó la capacidad clonogénica de las células 4T1.

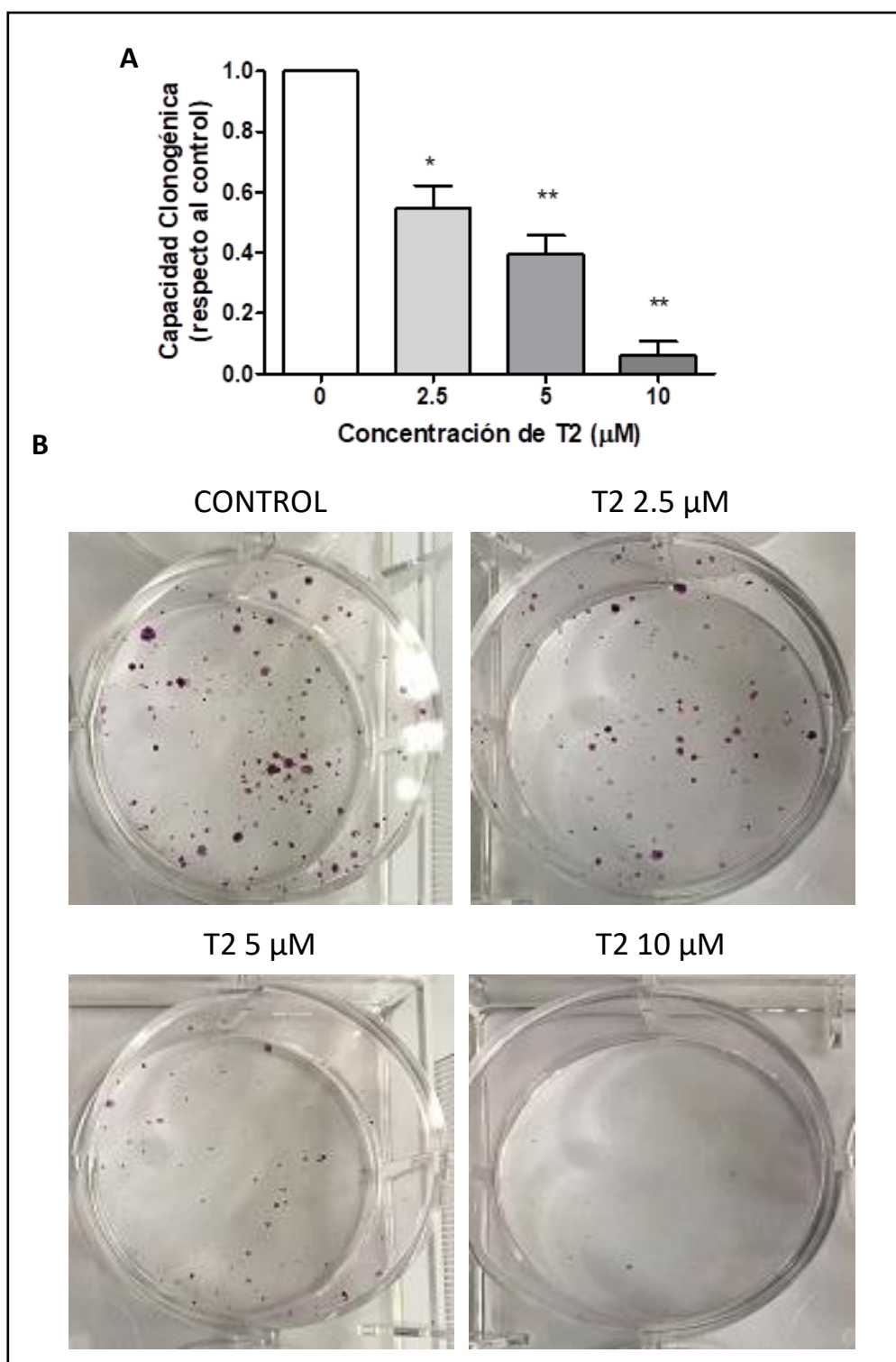


Figura 9. T2 disminuye la capacidad clonogénica de las células 4T1. Ensayo clonogénico realizado con células 4T1 previamente tratadas con T2 durante 24 horas. **A:** Cuantificación de la capacidad clonogénica, los resultados expresan la media y error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control. **B:** Fotografías representativas de un ensayo.

4.4 T2 reduce la capacidad migratoria de las células 4T1

Para formar metástasis, las células tumorales deben desprenderse del tumor primario y viajar a través del organismo, haciendo uso de los vasos sanguíneos y linfáticos. En este proceso, la migración celular es un factor clave.

Para saber si la capacidad migratoria de las células 4T1 se ve afectada por el tratamiento con T2 se realizó un ensayo de cierre de herida (Figura 10) donde se observó una marcada disminución en la capacidad de las células para migrar y cubrir el espacio vacío que pasó de un porcentaje de cobertura de $54 \pm 8\%$ en el control a $29 \pm 1\%$, $14 \pm 2\%$ y $15 \pm 1\%$ en los tratamientos con T2 2.5, 5 y 10 μM respectivamente.

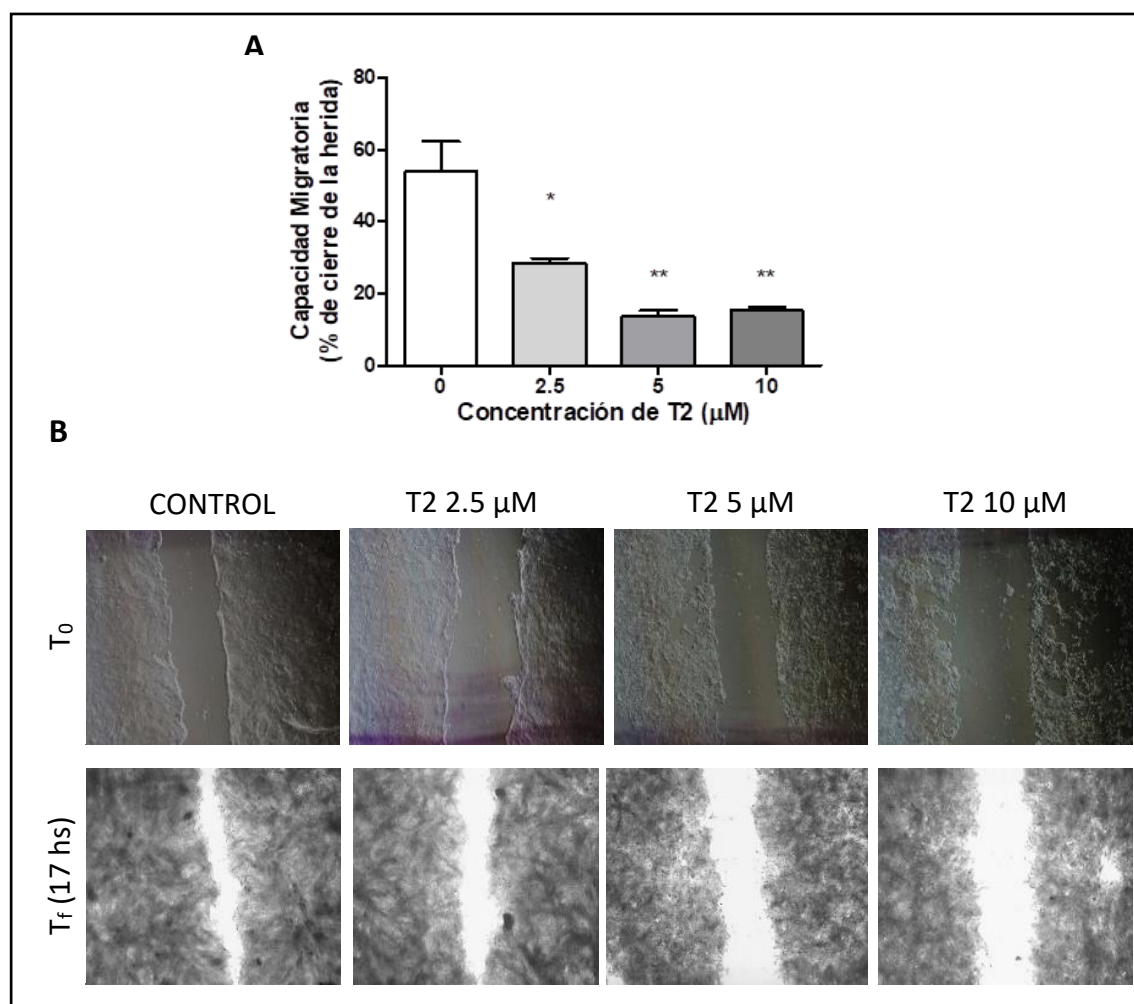


Figura 10. T2 reduce la capacidad migratoria de las células 4T1. Ensayo de cierre de herida sobre células 4T1 previamente tratadas con T2 por 24 horas. **A:** Cuantificación de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control. **B:** Micrografías representativas de uno de los ensayos (aumento 200x).

4.5 T2 reduce la capacidad invasiva de la línea celular 4T1

Otro fenómeno importante asociado a la capacidad metastásica es la invasión celular. Este proceso comienza con la degradación de la matriz extracelular y permite a las células tumorales infiltrar el tejido adyacente al tumor, atravesar los epitelios para la intravasación y extravasación celular e infiltrar otros tejidos.

Para analizar el efecto de T2 sobre la capacidad invasiva de las células 4T1 se sembraron células previamente tratadas con la TSC en cámaras *transwell* cubiertas con un extracto de matriz celular (*Matrigel*®) y se contó la cantidad de células que fueron capaces de atravesar este *coating* y llegar al filtro en la parte inferior de la cámara. En la Figura 11A se observa que el número de células que pudieron degradar y atravesar el extracto de matriz fue significativamente menor ($p<0.05$) para las tres concentraciones de T2 ensayadas con respecto al control.

Dentro de las enzimas responsables de degradar la matriz extracelular se encuentran las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9. La actividad de estas dos enzimas puede evidenciarse por la degradación de gelatina en zimografías realizadas con medios condicionados. Las zimografías de los medios condicionados obtenidos luego de tratar a las células 4T1 con T2 (Figura 11B) mostraron una disminución significativa en la actividad gelatinasa de MMP-9 en los medios de células tratadas con T2 10 μ M ($34.6\pm 0.7\%$ respecto al control, $p<0.05$) y no se observó alteración en la actividad de MMP-2.

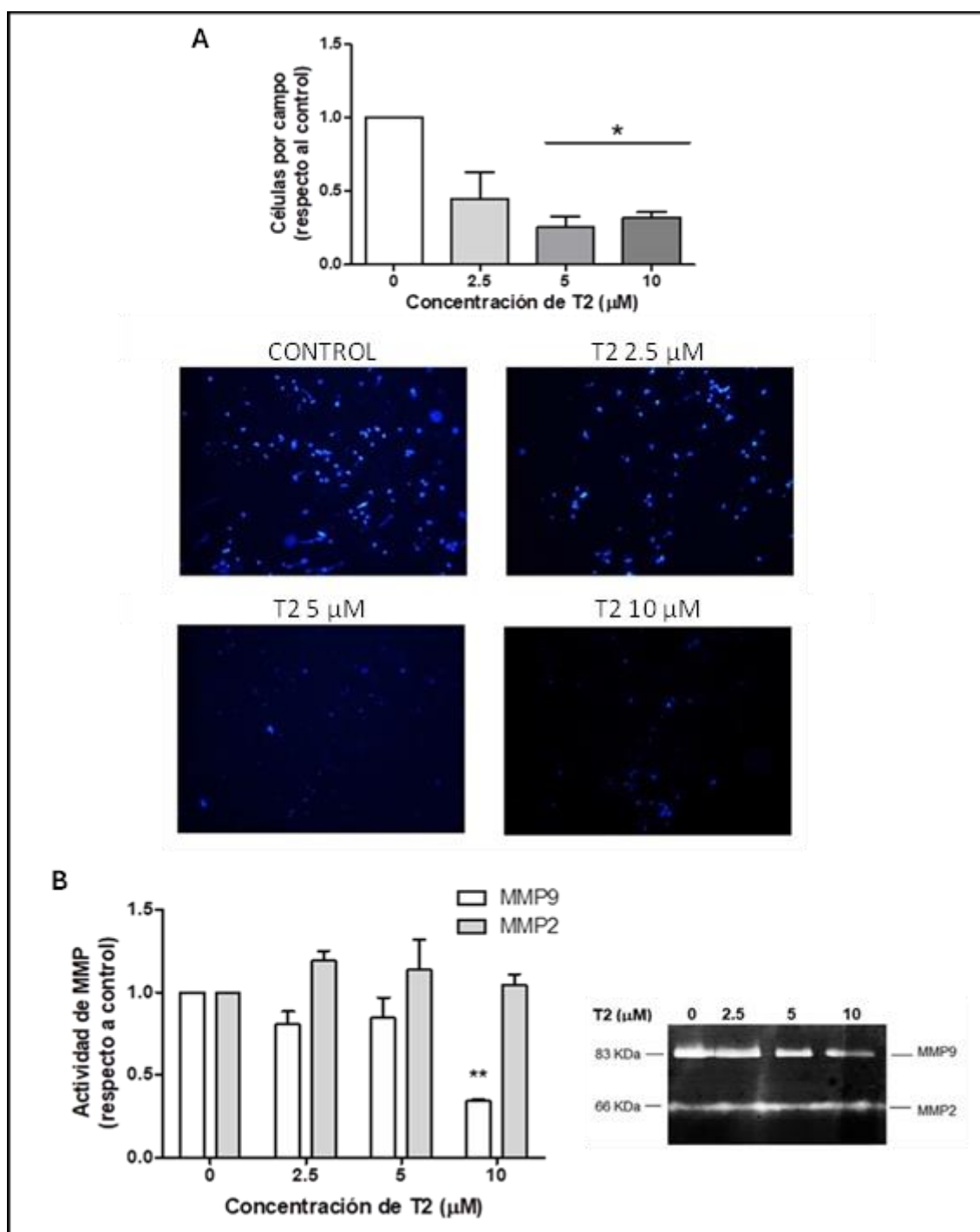


Figura 11. T2 reduce la capacidad invasiva de las células 4T1. A: Ensayo de invasión en cámara *transwell* cubierta con *Matrigel*; cuantificación de tres experimentos independientes, $*p < 0.05$; micrografías representativas (aumento 400x). Los resultados se expresan como la media y el *error* estándar, $**p < 0.01$ y $*p < 0.05$ con respecto al control **B:** Zimografía con medios condicionados de células 4T1 previamente tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 24 horas, imagen representativa de un experimento, cuantificación de densidad óptica ponderada con la concentración total de proteínas de tres experimentos independientes, $**p < 0.01$ con respecto al control.

4.6 T2 reduce el número y la capacidad autorrenovativa de la subpoblación *stem* en la línea celular 4T1

Las mamosferas son estructuras originadas por células con cierta pluripotencialidad que son capaces de sobrevivir y proliferar en condiciones de *anoikis*. Para evaluar el efecto de T2 sobre esta población, células 4T1 previamente tratadas con la TSC fueron sembradas en condiciones que favorecen la formación de esferas. Posteriormente se determinaron el número y el diámetro de las esferas formadas. Como puede verse en la Figura 12, el pre-tratamiento con T2 en las concentraciones 5 y 10 μM resultó en la formación de una menor cantidad de mamosferas ($36\pm 12\%$ y $5\pm 3\%$ con respecto al control, $p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente), lo que puede asociarse a una menor cantidad de células madre tumorales presentes. Al mismo tiempo, T2 disminuyó el diámetro de las esferas formadas (control: $245\pm 6\mu\text{m}$, T2 5 μM : $156\pm 4\mu\text{m}$, T2 10 μM : $107\pm 3\mu\text{m}$, $p<0.05$), un indicador de la capacidad autorrenovativa de las células madre tumorales.

Estos resultados fueron verificados a través de citometría de flujo. Células 4T1 tratadas con T2 fueron marcadas con una combinación de anticuerpos específica para el linaje *stem* de mama. De esta manera, se identificaron como células madre tumorales aquellas que marcaron Lin(-)/CD24(+)/CD29(alto) (Hsu *et al.*, 2018; Shackleton *et al.*, 2006). Como puede observarse en la Figura 13A, esta población se vio significativamente reducida tras el tratamiento con T2 en las tres concentraciones ensayadas.

Por otro lado, se estudió por RT-qPCR la expresión del ARNm de tres genes asociados al estado pluripotente de las células: Sox-2, Nanog y Oct-4 (Boyer *et al.*, 2005). Concordantemente con los resultados anteriores, el tratamiento con T2 en las tres concentraciones ensayadas resultó en la reducción significativa de la expresión de los tres ARNm (Figura 13B).

Finalmente, se evaluó el efecto de T2 sobre mamosferas ya formadas (Figura 14). El tratamiento con T2 5 y 10 μM mostró un efecto citotóxico directo sobre las esferas que llevó tanto a su disrupción como a la disminución de su número (reducción del $49\pm 13\%$ y $52\pm 11\%$ con respecto al control, $p < 0.05$). Por otro lado, no hubo variación en el diámetro de las esferas remanentes.

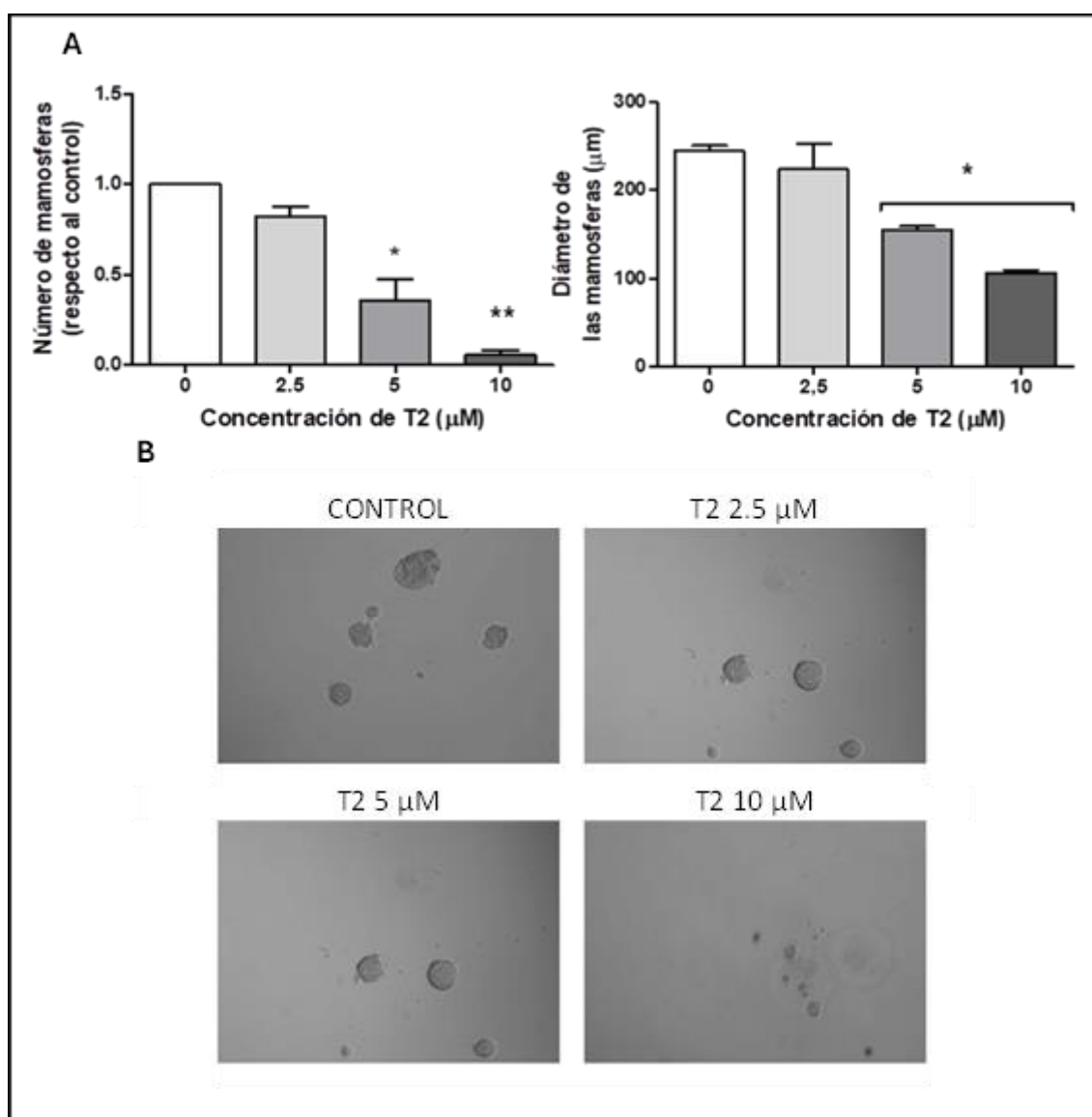


Figura 12. T2 disminuye la capacidad formadora de mamosferas de las células 4T1. A: Ensayo de formación de esferas con células 4T1 previamente tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 24 horas, cuantificación de número y diámetro de las esferas. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control. **B:** Micrografías representativas de uno de los tres ensayos (magnificación 200x).

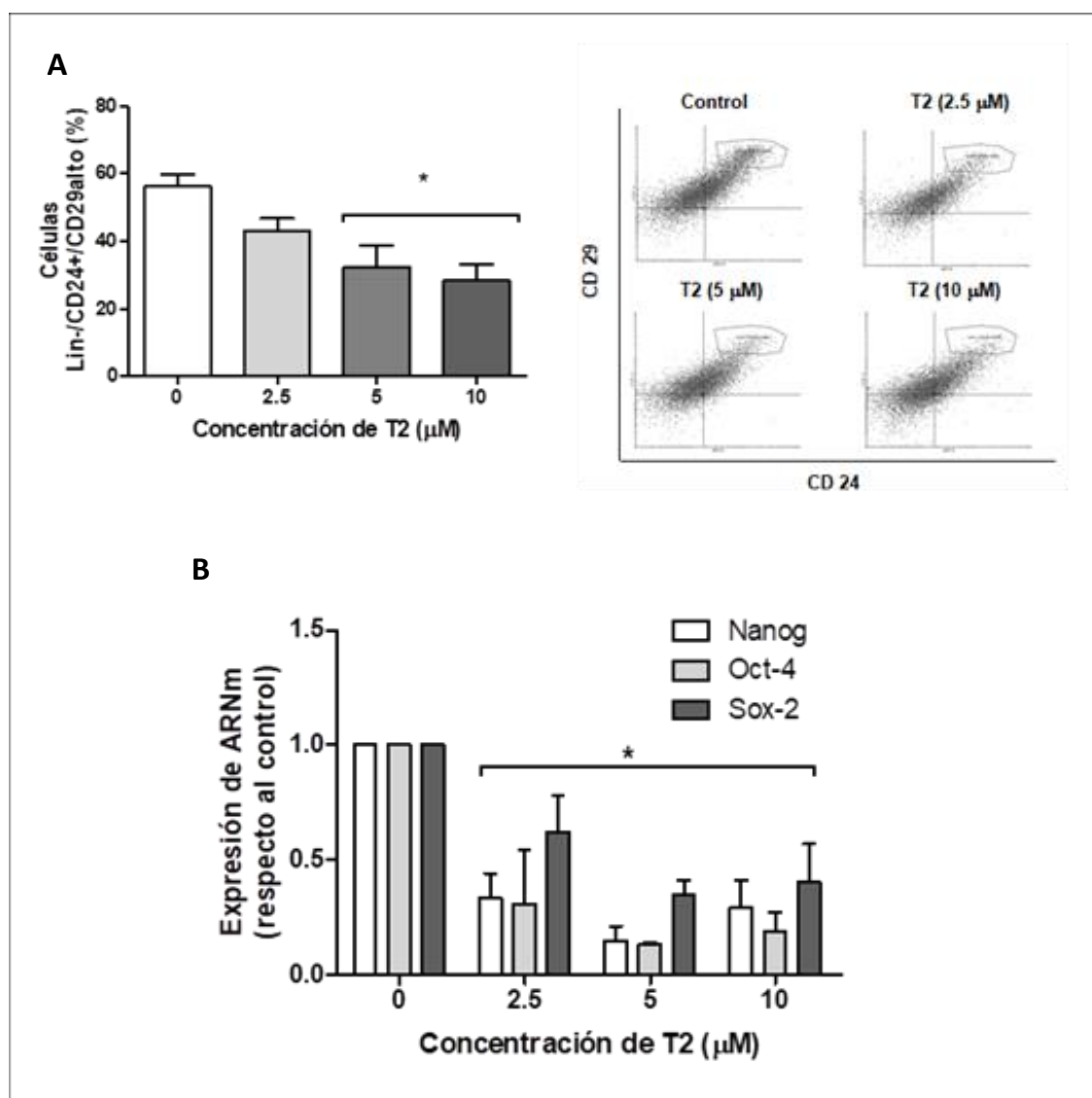


Figura 13. T2 reduce la población *stem* y la expresión de genes pluripotenciales en las células 4T1. **A:** Citometría de flujo de células tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μ M) o DMSO (control) por 24 horas y marcadas con anticuerpos Lin, anti-CD24 y anti-CD29, cuantificación de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como media y error estándar, *p<0.05 respecto al control. **B:** Gráfico representativo de un experimento. **C:** Expresión de ARNm de los genes de pluripotencialidad Sox-2, Nanog y OCT-4. Los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, *p<0.05 con respecto al control.

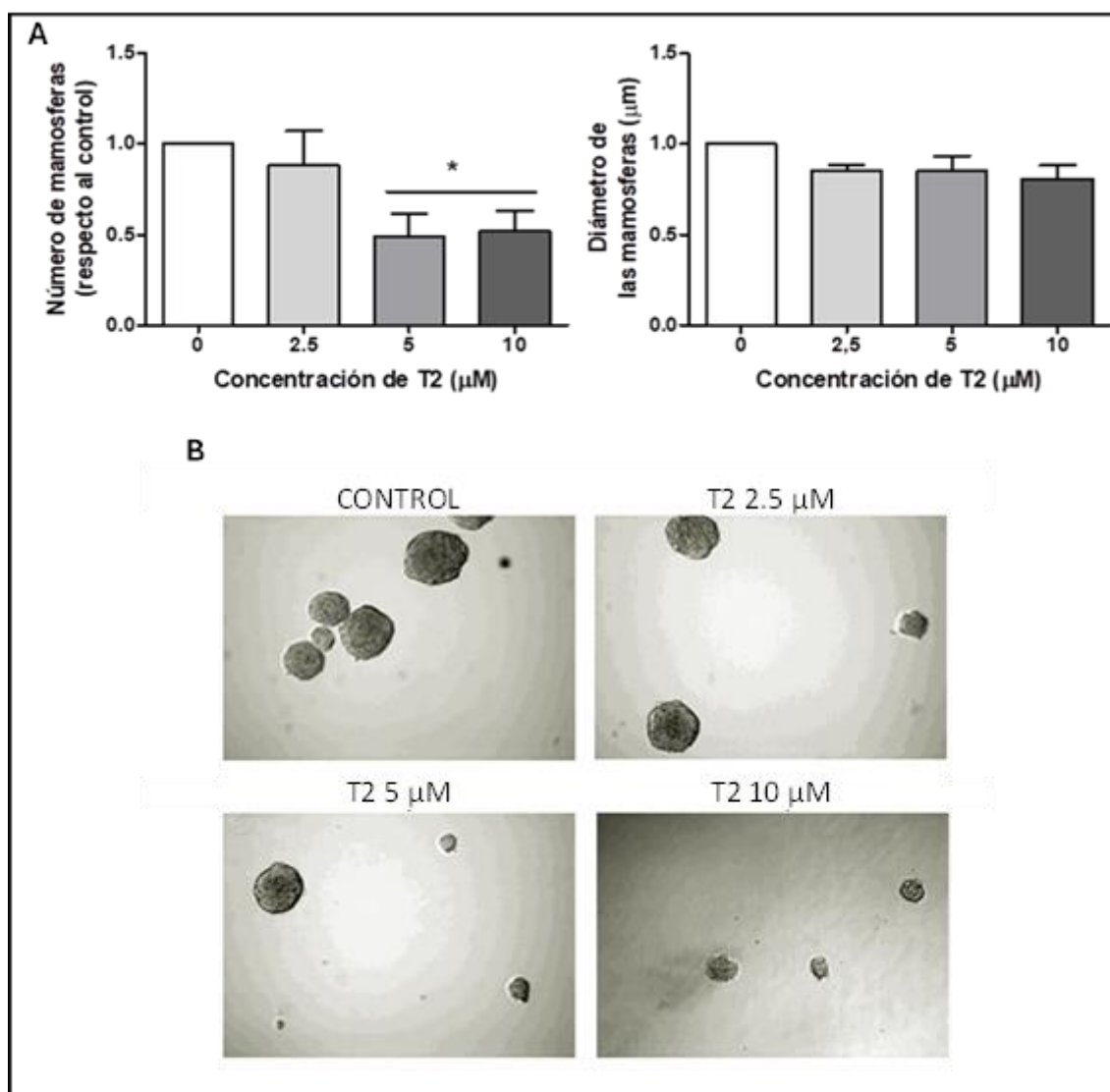
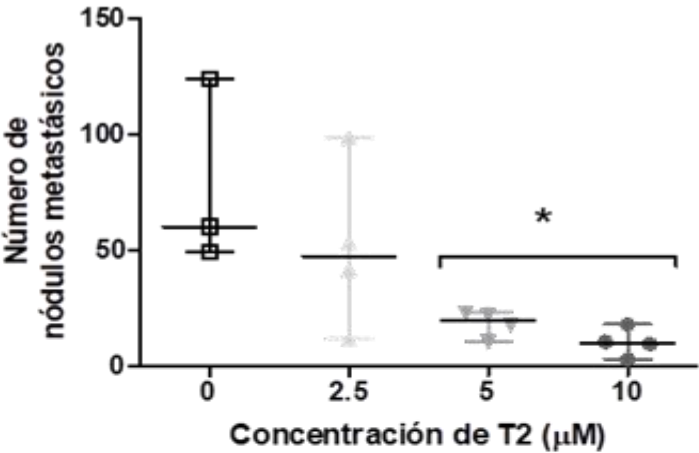


Figura 14. T2 afecta la estabilidad de las mamosferas formadas por células 4T1. A: Mamosferas ya formadas tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 48 horas, número de esferas y diámetro de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ con respecto al control. **B:** Micrografías representativas de A (magnificación 200x).

4.7 T2 reduce la capacidad de formar metástasis experimentales de las células 4T1

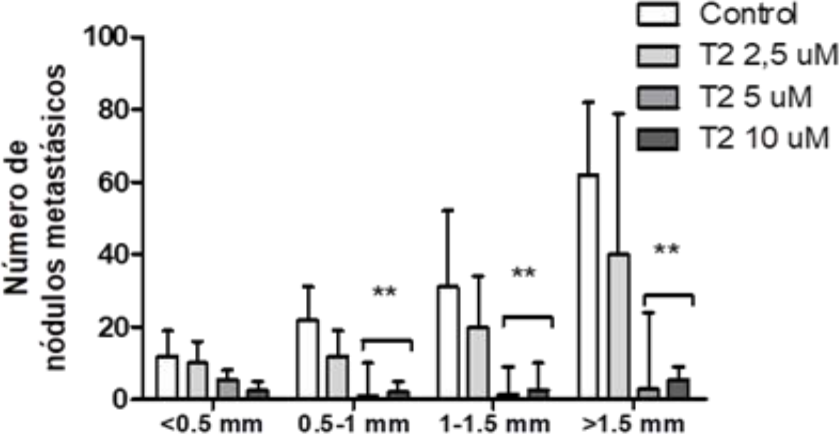
Teniendo en cuenta los resultados previamente descritos en los que se observó que la TSC afecta fenómenos cruciales para el desarrollo de la metástasis como la invasión, la migración y la clonogenicidad así como a la población *stem*, se realizó un ensayo *ex vivo* de metástasis experimentales para evaluar el efecto de T2 sobre la capacidad de las células 4T1 para colonizar el pulmón de ratones BALB/c considerando que este órgano es un blanco frecuente de metástasis . La inoculación intravenosa de células previamente tratadas con T2 5 y 10 μ M resultó en un número significativamente menor de nódulos metastásicos macroscópicos en pulmón ya sea considerando cantidad total de nódulos (Figura 15A) o discriminando por el tamaño de los mismos (Figura 15B).

A



T2 (μM)	0	2.5	5	10
Mediana	60	48	20	10
Rango	49-124	12-99	10-23	3-18

B



C

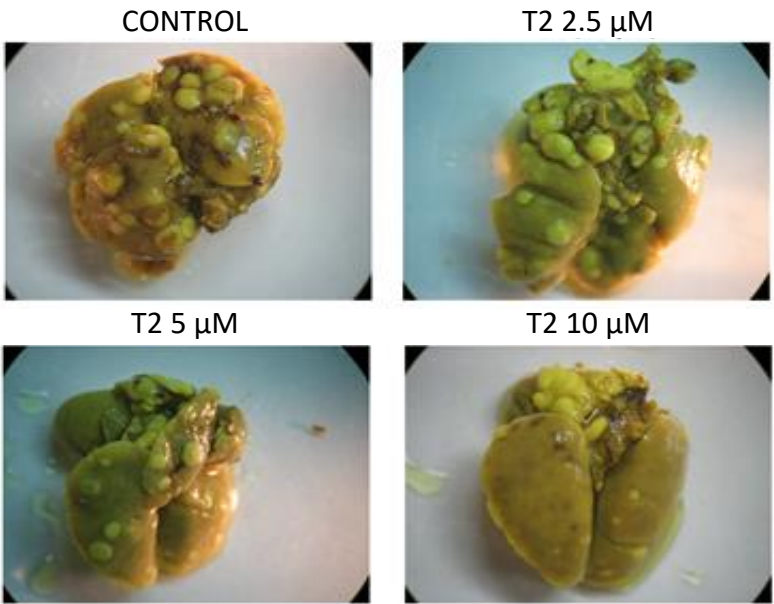


Figura 15. T2 reduce las metástasis pulmonares experimentales de células 4T1. **A:** Número de focos metastásicos en pulmón de ratones BALB/c 21 días post inoculación intravenosa de células 4T1 tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μ M) o DMSO (control) por 24 horas, cuantificación de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ con respecto al control. **B:** Discriminación por tamaño de los focos metastásicos, ** $p < 0.01$. **C:** Fotos representativas obtenidas con lupa estereoscópica.

4.8 T2 induce un fenotipo más epitelial en las células 4T1

Otra característica relevante para el pronóstico y tratamiento de un tumor es el grado de diferenciación de las células que lo componen. Por lo general, se habla de fenotipo más diferenciado o epitelial y fenotipo más indiferenciado o mesenquimático. Esta transición entre fenotipos epitelial y mesenquimático es clave en el proceso metastásico. Son las células menos diferenciadas las que poseen la capacidad de escapar al tumor primario, llegar a tejidos distantes y colonizarlos por lo que es deseable que las terapias oncológicas frenen este cambio o induzcan el proceso opuesto.

Dado que las células 4T1 son consideradas pobremente diferenciadas (De Souza Garcia *et al.*, 2014), resultó interesante ver si este aspecto era modulado por T2.

Las células más diferenciadas hacia un fenotipo epitelial tienden a ser menos invasivas, en parte, debido a la expresión de proteínas de unión como la E-cadherina que dificultan su escape de la arquitectura tisular. Como puede observarse en la Figura 16A, el tratamiento con T2 resultó en un aumento significativo en la expresión de E-cadherina. Además, este aumento se vio acompañado por una disminución en la expresión de actina de músculo liso alfa (α SMA) (Figura 16B), marcador de células con un fenotipo más mesenquimal (Kalluri y Weinberg, 2009).

Como complemento a la expresión de estos dos marcadores, se utilizó la marcación con faloidina-FITC para evaluar la disposición de las fibras de actina en las células 4T1 después de ser tratadas con la TSC. Como se observa en la Figura

17, las células control mostraron filamentos de actina desorganizados, característicos de células poco diferenciadas. Esta distribución cambió significativamente al aplicar el tratamiento con T2, observándose una disposición de actina cortical, característica de células epiteliales diferenciadas. Esto puede apreciarse en la Figura 17B que muestra la intensidad de fluorescencia a lo largo de una recta transversal a la célula que atraviesa el núcleo, donde un perfil convexo denota acumulación de actina en la región cortical.

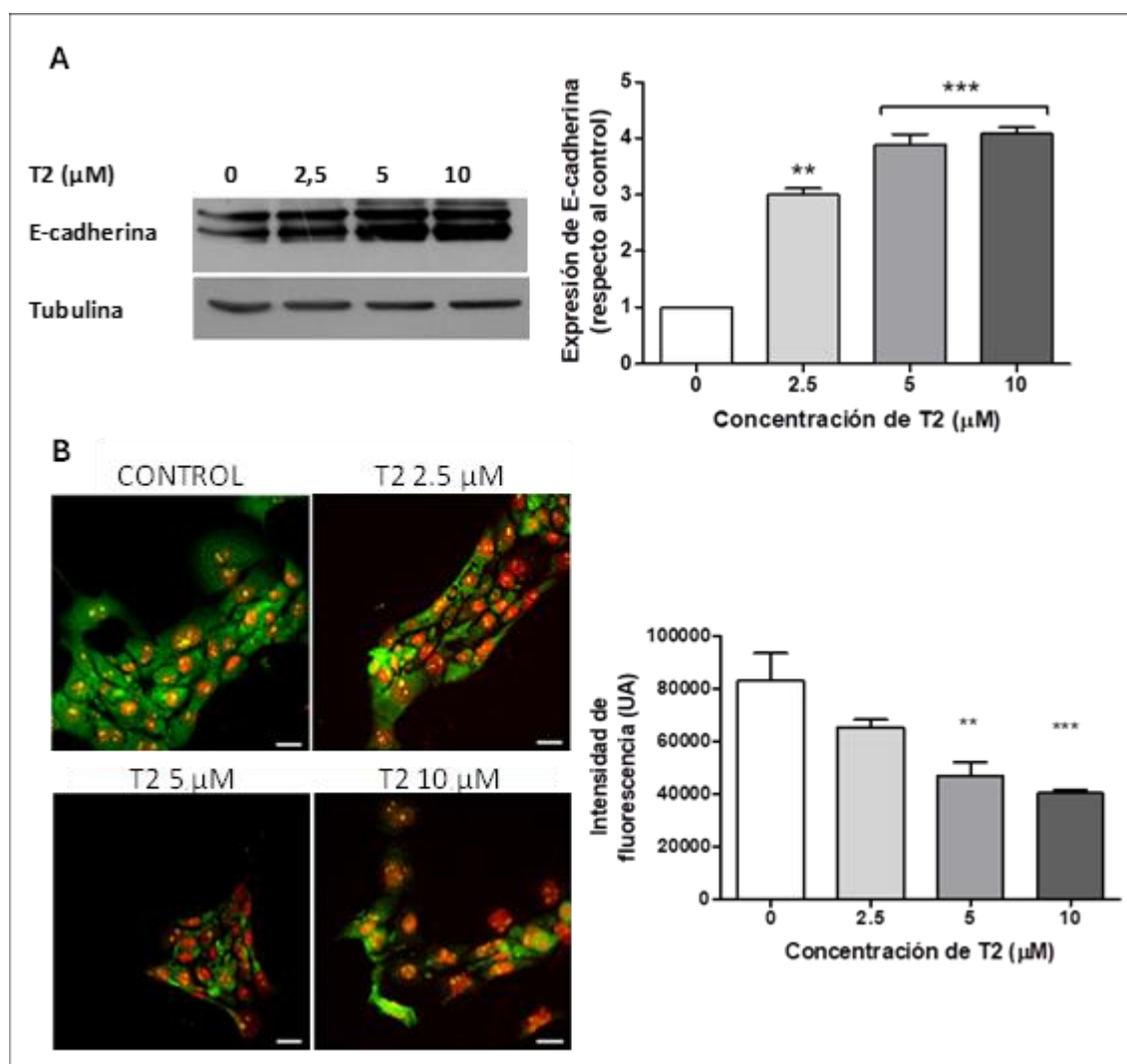


Figura 16. T2 induce un fenotipo más epitelial en las células 4T1. A: Expresión de E-cadherina evaluada por *Western Blot* en células 4T1 tratadas con DMSO o T2 (2.5, 5 o 10 μ M) por 24 horas. Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. **B:** Expresión de α -SMA (verde) evaluada por inmunofluorescencia en células 4T1 tratadas con DMSO o T2 (2.5, 5 o 10 μ M) por 24 horas, marcación nuclear con yoduro de propidio (naranja). Imágenes (magnificación 400x) representativas de uno de los experimentos. Los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control.

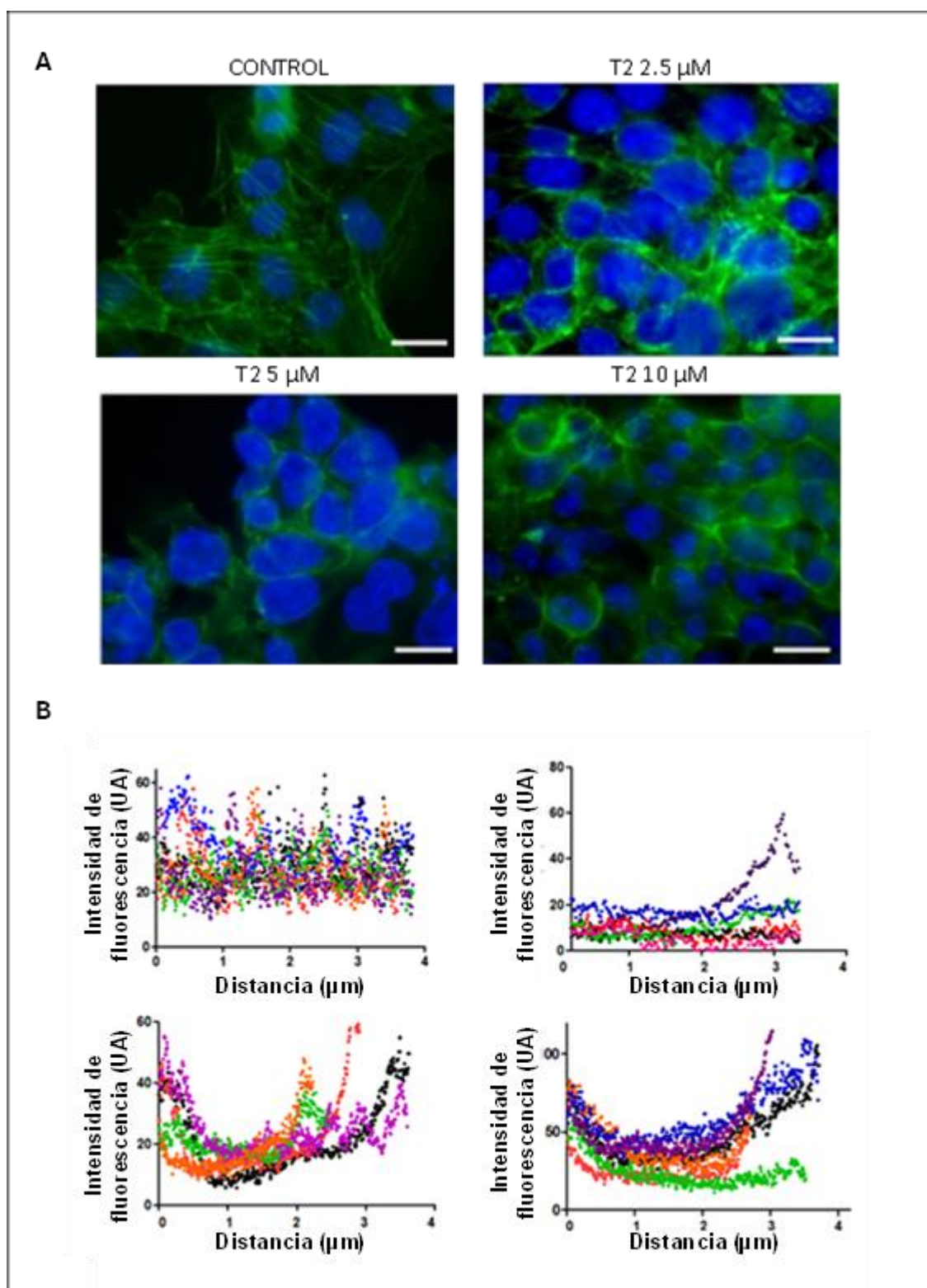


Figura 17. T2 induce un cambio en la disposición de los filamentos de actina en las células 4T1. A: Marcación con faloidina-FITC en células 4T1 tratadas con DMSO o T2(2.5, 5 o 10 μ M) por 24 horas. Imágenes representativas (magnificación 1000x). **B:** Perfiles representativos de distribución celular de faloidina-FITC (intensidad de fluorescencia), cada línea representa una célula.

4.9 T2 induce la expresión de NDRG1 de forma post transcripcional

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en la Introducción sobre el rol de la regulación de NDRG1 en la acción de algunas TSCs y dado que esta regulación puede darse tanto a nivel de la transcripción como de la traducción (Le y Richardson, 2004), se evaluó la expresión de ARNm y proteína correspondientes a NDRG1. Como se muestra en la Figura 18, ninguna de las concentraciones ensayadas de T2 resultó en cambios en la presencia de ARNm para NDRG1 mientras que los tratamientos 2.5, 5 y 10 μ M resultaron en una expresión significativamente mayor a nivel de la proteína (1.6 ± 0.1 , 1.5 ± 0.1 y 2.07 ± 0.05 respectivamente con respecto al control). Considerando estos resultados, el efecto de T2 sobre NDRG1 podría estar ocurriendo a nivel post transcripcional.

Dentro de los mecanismos de regulación post transcripcionales se encuentran los miRNA. Se ha reportado la regulación de NDRG1 mediante el miRNA miR-182-5p que actúa como inhibidor de su expresión a través de la interacción con la región 3'UTR del mensajero (Liu *et al.*, 2013). Haciendo uso de la técnica de *Stem Loop RT-qPCR*, se analizó la expresión de este miRNA y se encontró que, luego de 24 horas de tratamiento con T2 2.5, 5 o 10 μ M la presencia de miR-182-5p fue significativamente ($p<0.05$) menor con respecto al control.

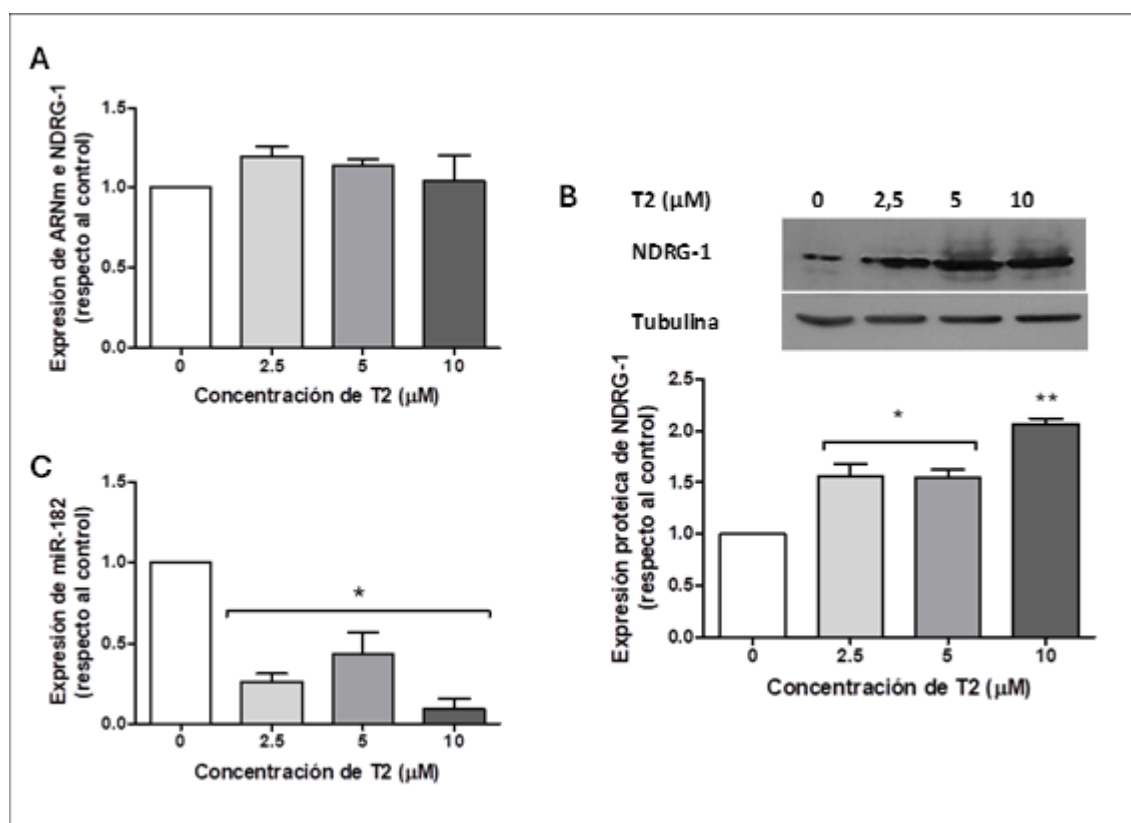


Figura 18. T2 modula la expresión proteica de NDRG1 en las células 4T1. **A:** Evaluación por *qPCR* de la expresión del ARNm de NDRG1 en células 4T1 tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 24 horas, **B:** *Western Blot* para NDRG1 en células 4T1 tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 24 horas. **C:** Expresión de miR-182-5p por *Stem Loop PCR* en células 4T1 tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μM) o DMSO (control) por 24 horas. Los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control.

4.10 T2 inhibe la TEM regulando negativamente la vía de Wnt-β-catenina

Está reportado que entre las interacciones de NDRG1 se encuentra LRP6, receptor de Wnt, y que de esta interacción resulta la inhibición de la vía de señalización (Liu *et al.*, 2012). Por este motivo y considerando los resultados previamente descritos en cuanto a la modulación del estado de diferenciación celular por parte de T2, se propuso estudiar el efecto de T2 sobre la vía de Wnt.

A tal efecto, se evaluó la expresión de ARNm de cuatro genes blanco de la señalización canónica de Wnt: Axina 2, CD44, c-Myc y TCF-7 (Cadigan y Waterman, 2012; Jho *et al.*, 2002; Wielenga *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2016) luego del tratamiento con T2 en conjunto con LiCl, un inductor de la vía (Costabile *et al.*,

2015). Luego de 24 horas de tratamiento, se observó que la concentración de T2 correspondiente al IC₅₀ redujo significativamente la expresión de Axina 2, CD44 y c-Myc, mostrando, además, una tendencia no significativa a la disminución de TCF-7 (Figura 19B).

Considerando que la activación de la vía de Wnt favorece la TEM, también se evaluó bajo las mismas condiciones la expresión de Snail, Twist y Vimentina, tres genes asociados positivamente a este proceso (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020; Usman *et al.*, 2021), y se encontró que T2 disminuyó significativamente la expresión de los mismos (Figura 19A).

Una de las moléculas efectoras de la vía Wnt- β -catenina es ZEB1, también llamada TCF-8. Como se observa en la Figura 19C y, bajo la inducción con LiCl, se observó un aumento de esta proteína que fue reducida significativamente ($p < 0.05$) al agregar T2 5 μ M al tratamiento con LiCl. Por otro lado, la expresión de β -catenina muestra una tendencia no significativa a disminuir bajo las mismas condiciones.

Dado que la β -catenina puede estar secuestrada en la membrana citoplasmática, resulta más relevante su localización que su cantidad, es decir, si está ejerciendo su rol como factor de transcripción en el núcleo. Para evaluar si el tratamiento con T2 afecta la actividad transcripcional de β -catenina se utilizó un ensayo de gen reportero con sitios de unión TCF/LEF (Figura 19D). Debido a que el proceso de transfección *per se* afecta la estabilidad de las células, estas resultaron particularmente sensibles a la inducción con LiCl y mostraron elevada citotoxicidad por lo que fue necesario utilizar otro inductor. Como alternativa se empleó TGF- β , potente inductor de la TEM que se vincula con la vía de Wnt a través de la señalización por Smad y Pi3K/Akt que resulta en la inhibición de GSK3 β (Vallée *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2009). La línea celular 4T1 expresa niveles basales de TGF- β elevados (Liu *et al.*, 2012) por lo que la inducción por TGF- β exógeno no llevó a una expresión significativamente mayor del reportero

mientras que la combinación de TGF- β con T2 resultó en señal de luciferasa significativamente menor que el control con y sin inducción.

Así como el miR-182-5p suele encontrarse aumentado en los tumores de mama con respecto al tejido normal, entre los miRNA de expresión disminuida se puede encontrar al miR-200c (Chen *et al.*, 2012; Mulrane *et al.*, 2013). El miR-200c participa en la regulación de la TEM modulando, entre otros blancos, la expresión de ZEB1 (Gregory *et al.*, 2008), proteína efectora de la vía de Wnt (Li *et al.*, 2014; Sánchez-Tilló *et al.*, 2011) cuya expresión también es inhibida por NDRG1 (Menezes *et al.*, 2019). Por consiguiente, se decidió analizar la posible regulación del miR-200c luego del tratamiento con T2. Como puede verse en la Figura 19E, el tratamiento con T2 resultó en cambios en la expresión de miR-200c, siendo significativamente mayor para las tres concentraciones ensayadas ($p < 0.05$) con respecto al control.

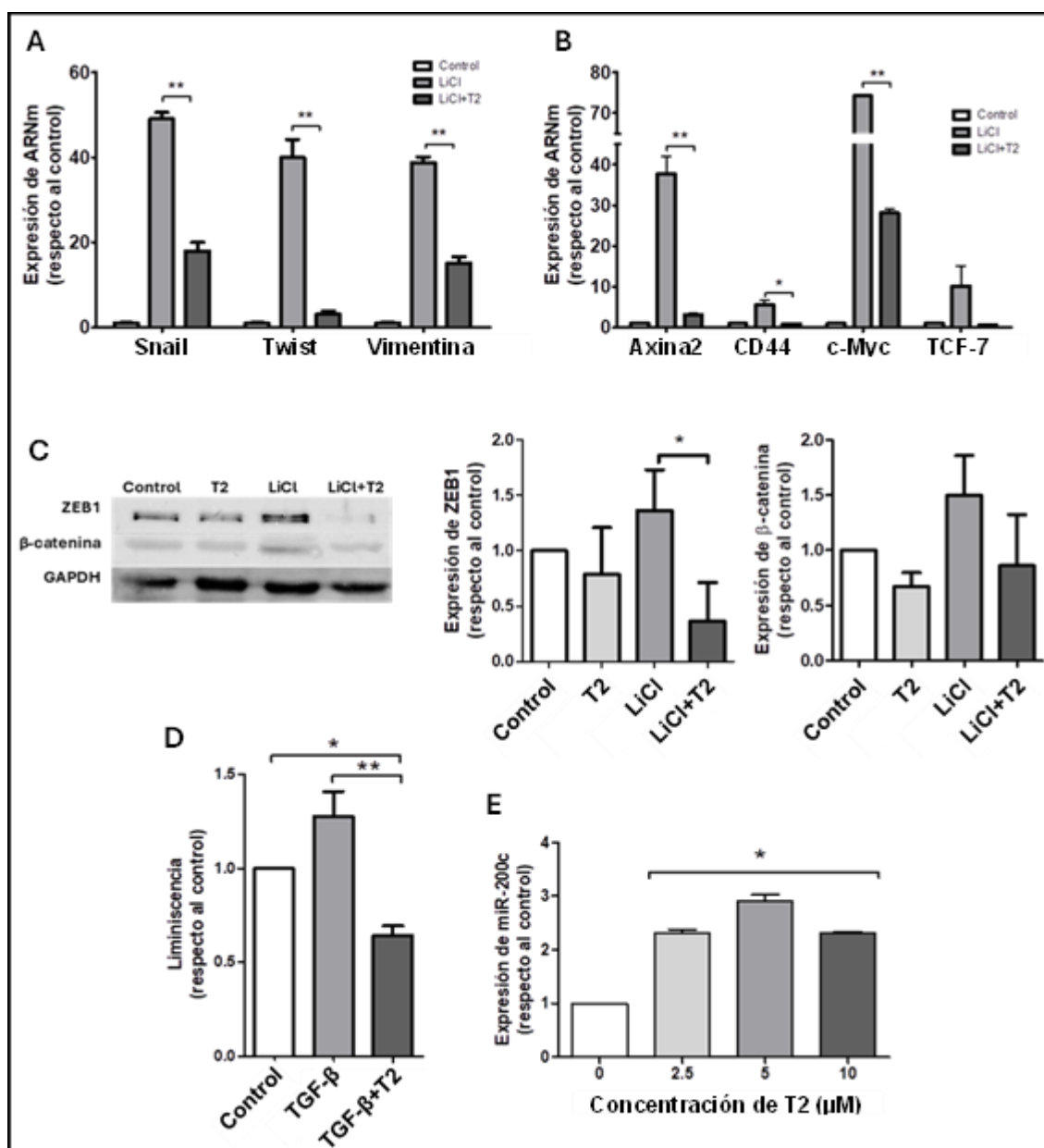


Figura 19. T2 modula la expresión de genes asociados a la TEM y a la vía de Wnt – β-catenina en las células 4T1. **A:** Evaluación por *qPCR* de la expresión de los ARNm de Snail, Twist y vimentina en células 4T1 tratadas con DMSO (control), el inductor LiCl 10mM o T2 5 μM + LiCl por 24 horas. **B:** Evaluación por *qPCR* de la expresión de los ARNm de Axina 2, CD44, c-Myc y TCF-7 en células 4T1 tratadas con DMSO (control), LiCl y T2 5 μM + LiCl por 24 horas. Los valores corresponden a la media y el error estándar de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto a las células tratadas con LiCl + DMSO únicamente. **C:** *Western Blot* ilustrativo para expresión de ZEB1 y β-catenina luego de 24 horas de tratamiento con T2 5 μM o DMSO en presencia de LiCl 10 mM. Análisis densitométrico de los *Western Blots* realizados. Los resultados se expresan como la media y el error estándar de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$. **D:** Actividad luciferasa en células 4T1 previamente transfectadas con reportero TOPFlash TCF/LEF y *Renilla* y posteriormente tratadas con DMSO (control), el inductor TGF-β 3 ng/ml y T2 5 μM + TGF-β por 24 horas, los resultados se expresan como media y error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ respecto al control, ** $p < 0.01$ con respecto a la inducción con TGF-β. **E:** Expresión de miR-200c por *Stem Loop PCR* en

células 4T1 tratadas con T2 (2.5, 5 o 10 μ M) o DMSO (control) por 24 horas. Los resultados se expresan como media y error estándar de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$ respecto al control.

4.11 Modelo murino subcutáneo

4.11.1 La administración intraperitoneal de T2 no produce efectos adversos en ratones BALB/c

Para poder evaluar la acción de T2 *in vivo*, inicialmente se determinó la dosis máxima de TSC tolerada por ratones BALB/c. La misma fue definida como aquella que resultara en la muerte de menos del 30% de los animales o que menos del 30% de los ratones perdiera más del 10% de su peso corporal.

Considerando la dosificación utilizada en estudios previos realizados con diversas TSCs (Guo *et al.*, 2016; Kovacevic *et al.*, 2011) se comenzaron los experimentos *in vivo* con cinco dosis intraperitoneales de T2 de 5, 25 y 50 mg/kg aplicadas día por medio. Como vehículo se utilizó 30% propilenglicol y 17% DMSO en solución fisiológica. Se agregó un grupo de ratones inoculados únicamente con la solución salina para descartar la toxicidad del vehículo.

Durante el período de tratamiento se produjo la muerte del 30% del grupo de ratones que recibió 50 mg/kg de T2 por lo que esta dosis debió ser descartada sin llegar a completar el esquema de 5 inyecciones. Al realizar la necropsia de estos ratones se encontraron depósitos de droga no metabolizada en la cavidad peritoneal.

Los ratones que recibieron el vehículo y las dosis de T2 de 5 mg/kg y 25 mg/kg no mostraron diferencia en su peso ni en su estado general de salud durante 30 días posteriores al inicio del tratamiento (Figura 20A).

Finalizado el período de observación, no se encontraron alteraciones morfológicas a simple vista durante la necropsia. Los hígados, riñones y pulmones fueron analizados por patólogos veterinarios, quienes no encontraron diferencias histopatológicas apreciables entre los distintos grupos.

También se extrajeron muestras de sangre en las que se midió la concentración de urea y de transaminasa glutámico oxalacética (TGO). Como se

aprecia en la Figura 20B y C, no se hallaron diferencias significativas en los valores de ambos indicadores para los distintos grupos de ratones, indicando que ni el vehículo ni las dosis utilizadas de T2 habían causado daño renal o hepático respectivamente.

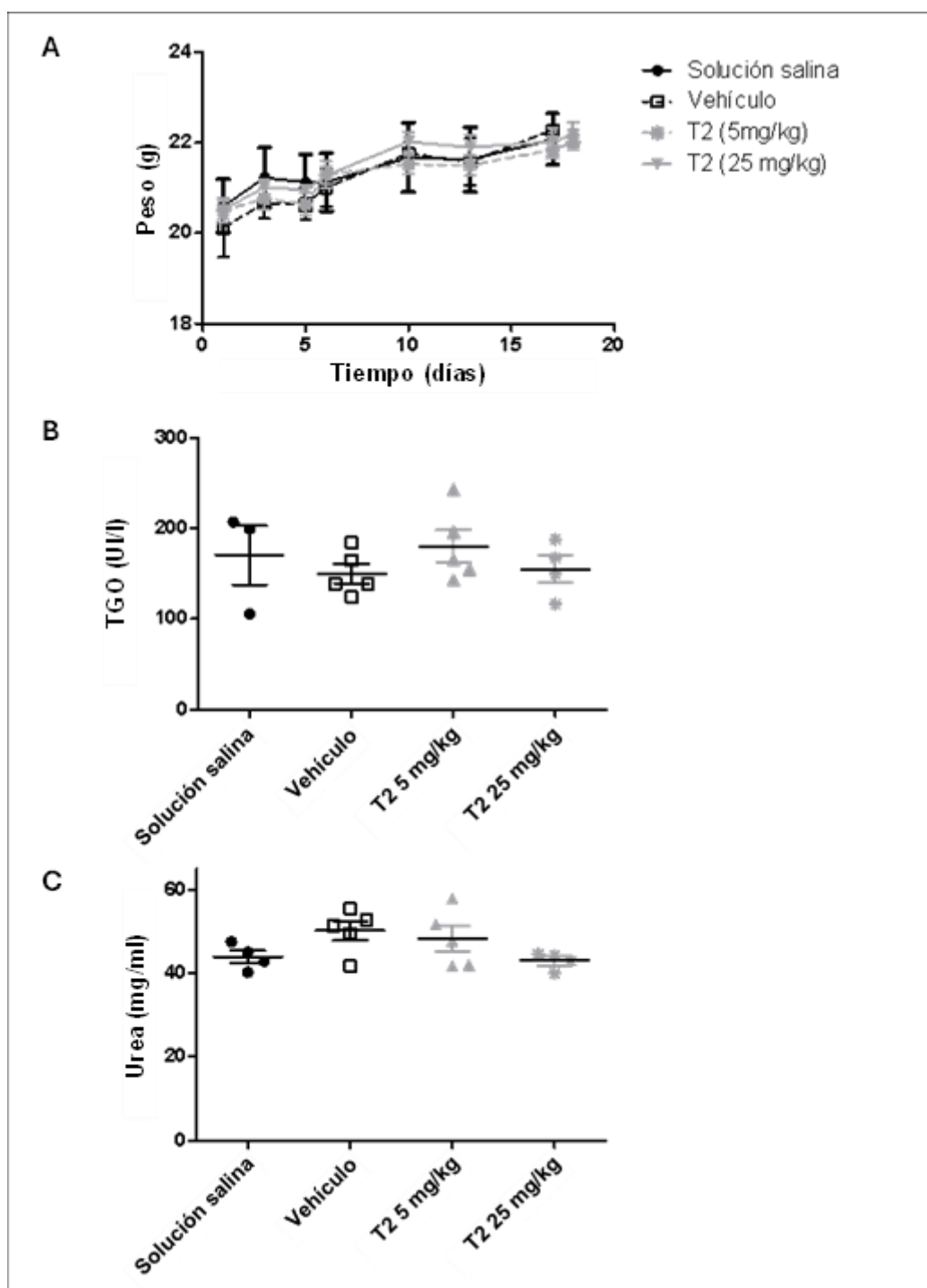


Figura 20. T2 no produce efectos adversos en ratones BALB/c. Ratones BALB/c fueron tratados con cinco dosis intraperitoneales administradas día por medio de solución salina, vehículo o T2 5 o 25 mg/kg. **A:** Peso de los ratones durante 20 días desde el inicio

del tratamiento. **B y C:** Concentraciones en plasma de TGO y urea respectivamente 20 días después de la primera dosis de tratamiento. Cada valor corresponde a la media con su desvío estándar.

4.11.2 T2 reduce el crecimiento y capacidad invasiva de tumores 4T1 en ratones BALB/c

Inicialmente se planteó medir el crecimiento tumoral en los ratones durante y después del tratamiento utilizando un calibre. Sin embargo, durante el progreso tumoral se notó que, al superar los pocos milímetros de diámetro, gran cantidad de los tumores crecían adheridos o atravesando el peritoneo, comportamiento previamente descrito para esta línea celular (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000).

Por este motivo, las medidas obtenidas con el calibre no resultaron representativas del tamaño tumoral real por lo que se utilizó como valor comparativo el peso de los tumores al finalizar el experimento. Como se muestra en la Figura 21A, los tumores extraídos de ratones que recibieron T2 tanto en la dosis de 5 como 25 mg/kg pesaron significativamente menos que los tumores del grupo control ($p<0.01$)

Por otro lado, se realizó un recuento mitótico en cortes histológicos de los tumores obtenidos, teñidos con hematoxilina-eosina (Figura 21B), observándose un número significativamente mayor de figuras mitóticas en los tumores del grupo control con respecto a aquellos que habían recibido T2 tanto en la dosis de 5 como la de 25 mg/kg (control: 23 ± 1 mitosis/campo, T2 5 mg/kg: 14.0 ± 0.6 mitosis/campo y T2 25 mg/kg: 7.7 ± 0.7 mitosis/campo, $p<0.001$)

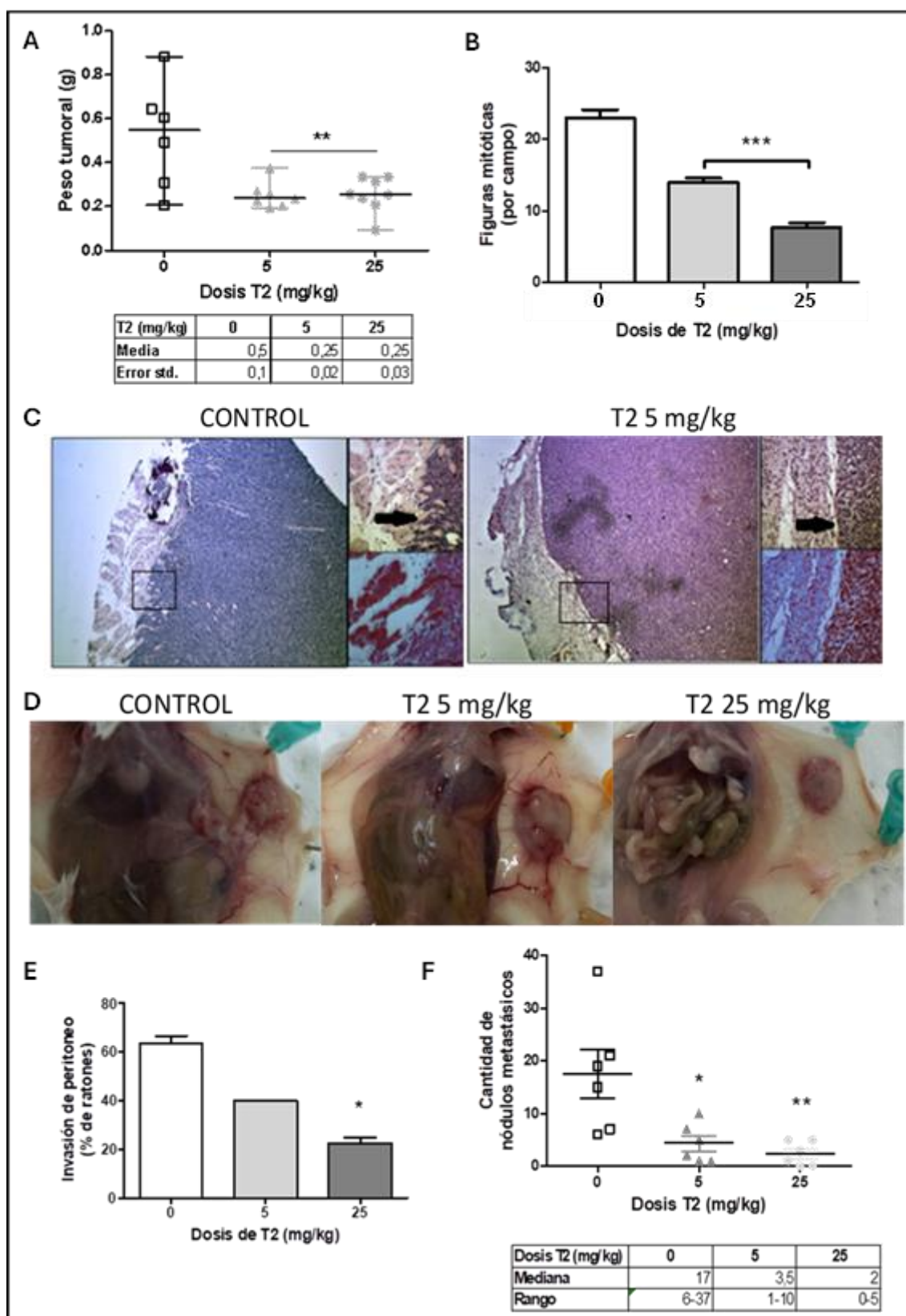


Figura 21. El tratamiento con T2 *in vivo* reduce el crecimiento y la capacidad invasiva del tumor 4T1 en ratones BALB/c. Ratones inoculados subcutáneamente con 40000 células 4T1 fueron posteriormente tratados con el vehículo o T2 (5 o 25 mg/kg) durante 10 días y fueron sacrificados al cabo de 4 semanas de iniciado el experimento (n=6 ratones por grupo por réplica). **A:** Peso de los tumores al momento de la necropsia,

gráfico representativo de uno de tres experimentos independientes, $**p<0.01$ respecto al vehículo. **B:** Recuento de figuras mitóticas en cortes de tumor teñidos con hematoxilina-eosina, se expresa la media de figuras por campo y su error estándar para tres experimentos independientes, $***p<0.001$ respecto al vehículo. **C:** Imágenes representativas de cortes teñidos con hematoxilina-eosina (paneles izquierdo magnificación 100x y superior derecho 200x) y tricrómico de Masson (panel inferior derecho, magnificación 200x). **D:** Fotografías ilustrativas de la invasión peritoneal. **E:** Porcentaje de tumores que invadió el peritoneo, media y error estándar de tres réplicas independientes $*p<0.05$ con respecto al vehículo. **F:** Recuento de metástasis pulmonares espontáneas, se muestran medianas y rangos de un experimento representativo de tres experimentos independientes, $*p<0.05$ y $**p<0.01$ respecto al grupo tratado con vehículo.

Como se mencionó anteriormente, la línea 4T1 forma tumores que tienen la capacidad de atravesar e invadir peritoneo y, considerando que una de las propiedades biológicas de estas células estudiadas *in vitro* fue la invasión, se prestó especial atención a la distribución de los tumores.

Inicialmente, al tratar con T2, se observó una tendencia a disminuir la proporción de animales con tumores que presentaron invasión peritoneal, $63\pm3\%$ para el grupo control vs. $40\pm1\%$ para el grupo que recibió T2 5 mg/kg, siendo significativamente menor ($23\pm3\%$, $p<0.05$) al aplicar la dosis de 25 mg/kg (Figura 21E).

A nivel microscópico, se pudo observar en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson que los tumores del grupo control poseían bordes poco definidos con fibras de colágeno desorganizadas mientras que los tumores tratados con T2 mostraron bordes bien definidos, con fibras de colágeno más organizadas y células con un fenotipo más epitelial que se condice con lo visto *in vitro* en cuanto a diferenciación (Figura 21CyD).

Teniendo en cuenta estos hallazgos y los resultados previamente observados *in vitro* mediante los ensayos de invasión y migración, se procedió a evaluar el número y tamaño de los focos metastásicos pulmonares.

Tras extraer los pulmones de los ratones y fijarlos con la solución de Bouin, se realizó un recuento bajo lupa, encontrándose una cantidad de nódulos metastásicos significativamente menor en los pulmones de aquellos ratones que recibieron T2 (Figura 21F).

4.12 Modelo murino intraductal

4.12.1 Optimización del modelo

Habiendo visto que el tratamiento con T2 afecta las capacidades metastásica e invasiva de las células 4T1 tanto *in vitro* como *in vivo*, se propuso trabajar con un modelo murino de inoculación intraductal, el cual refleja las características de la transición de carcinoma *in situ* a carcinoma invasor (Atiya *et al.*, 2019; Behbod *et al.*, 2009).

Considerando la diversa bibliografía existente sobre el modelo de inoculación intraductal con células 4T1 (Atiya *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2020; Steenbrugge *et al.*, 2021), para la puesta a punto de esta técnica (Figura 22) se inocularon inicialmente 35000 células en cada cuarta mama de ratones BALB/c hembras de entre 11 y 14 semanas de edad. Como puede observarse en las imágenes de *wholemout* de la Figura 22A, se encontraron focos de crecimiento tumoral bien definidos a partir de los 7 días post inoculación. Luego de 14 días las mamas estaban casi completamente cubiertas por tumores, algunos de ellos incluso palpables. Por lo tanto, se decidió disminuir el número de células a inocular.

Se realizó una segunda prueba con 15000 células inoculadas por mama. En este caso, pasados 7 días de la inoculación, se observaron en los *wholemout* de las glándulas algunos pequeños focos de crecimiento tumoral definido junto con engrosamiento de varios ductos mamarios, lo que reflejaría la potencial presencia de células tumorales en su interior. Concordantemente, 14 días después de la inoculación, las glándulas mostraron además de ductos ensanchados, focos tumorales de tamaño suficiente para suponer un posible escape de las células tumorales desde el lumen ductal hacia el tejido mamario, sin que su tamaño comprometiera la integridad de la mama y dificultara posteriores análisis histológicos.

Posteriormente, cortes de las glándulas inoculadas con 15000 células teñidos con hematoxilina-eosina fueron observados al microscopio. El recuento y clasificación de los ductos se realizó con los siguientes criterios: lumen sin células (ducto vacío), con células sólo dentro del ducto (carcinomas *in situ*), con células infiltrantes atravesando la pared ductal (carcinomas invasores) (Figura 22B y C). Al comparar las glándulas de 7 y 14 días, se observó una proporción similar de ductos vacíos junto con una disminución significativa en la proporción de focos tumorales *in situ* a expensas de un aumento en la cantidad de focos invasores 14 días post inoculación intraductal.

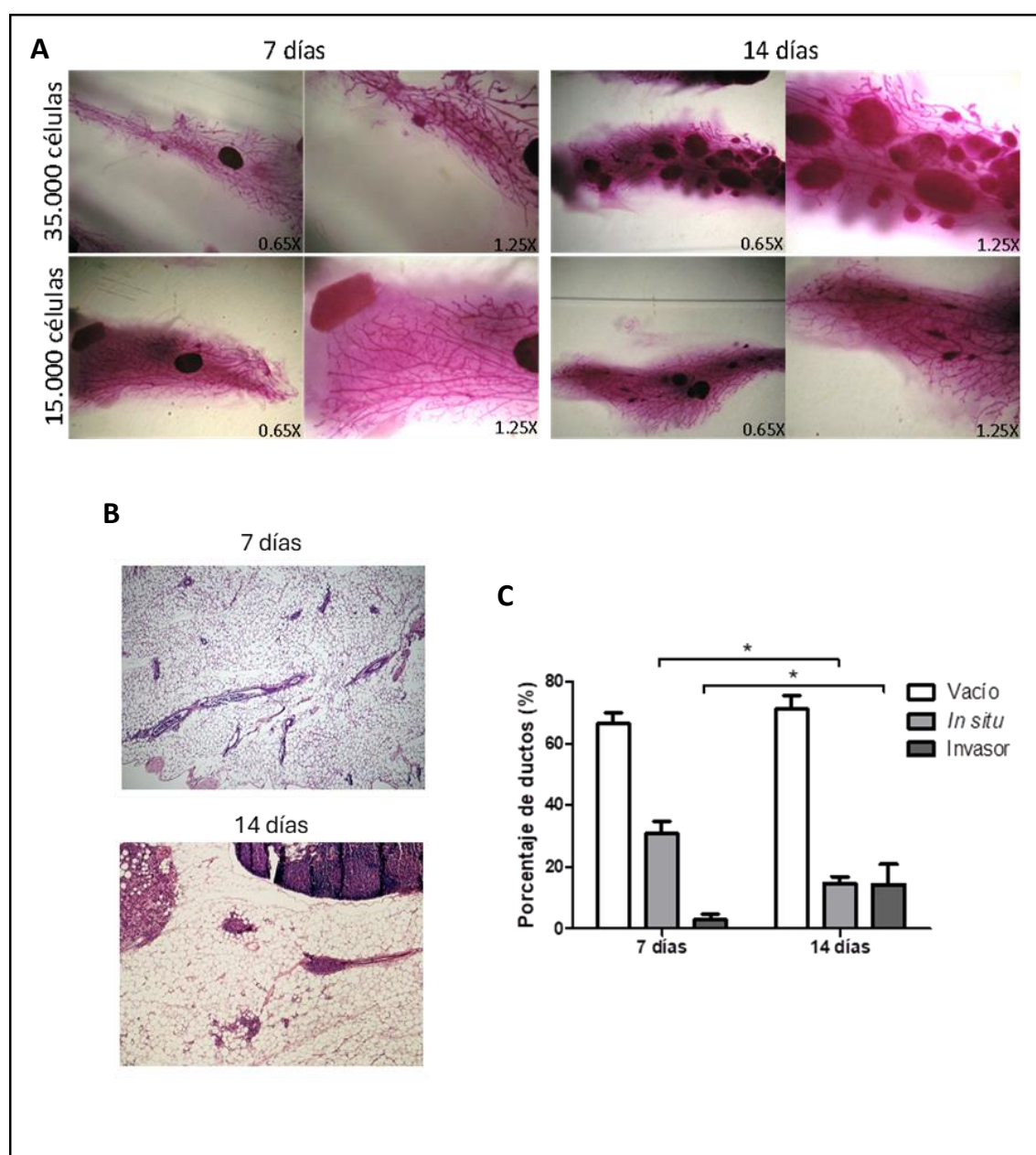


Figura 22. Optimización del modelo de inoculación intraductal de células 4T1 en ratones BALB/c. **A:** *Wholemout* de las mamas extraídas 7 o 14 días después de haber inoculado 15000 o 35000 células en ratones BALB/c, imágenes obtenidas bajo lupa estereoscópica. **B:** Micrografías representativas de cortes de mamas inoculadas con 15000 células 4T1 extraídas 7 o 14 días post-inoculación, teñidos con hematoxilina-eosina (magnificación 40x). **C:** Recuento de estado de los ductos (vacíos, con crecimiento celular *in situ* o invasor) observados en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se muestran media y error estándar de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$.

4.12.2 Caracterización

Con el fin de caracterizar en mayor detalle el modelo, cortes de las glándulas mamarias fueron sometidos a inmunofluorescencia para el marcador mesenquimal vimentina y el marcador de proliferación PCNA (Figura 23A). Como puede observarse en la Figura 23C, tanto los tumores *in situ* como invasores fueron positivos para vimentina sin observarse diferencias significativas en el nivel de expresión de este marcador en ambos estadios tumorales

Para obtener el índice de proliferación celular, se compararon las áreas nucleares (DAPI) con el área marcada por PCNA y se encontró un aumento significativo ($p < 0.01$) en la proliferación de las células tumorales en las muestras de 14 días ($29 \pm 7\%$) con respecto a las de 7 días ($12 \pm 4\%$) (Figura 23D).

El anticuerpo pan-citoqueratina (pan-Cq) se utilizó para marcar tanto las células epiteliales que componen la pared de los ductos como las del tumor. El anticuerpo anti-actina de musculo liso (α -SMA) que marca a las células mioepiteliales, permitió determinar la integridad ductal y confirmar focos de invasión donde la marca se encontró interrumpida (Russell *et al.*, 2015) (Figura 23B)

Para evaluar además algunos componentes del infiltrado inflamatorio se estableció el cociente entre las células CD4+ y CD8+. Como se muestra en la Figura 23E, se registró una disminución significativa de este cociente asociada a la progresión tumoral (4.5 ± 2 a 7 días vs 1.4 ± 0.6 a 14 días, $p < 0.05$) a expensas del aumento en la cantidad de células CD8+ presentes.

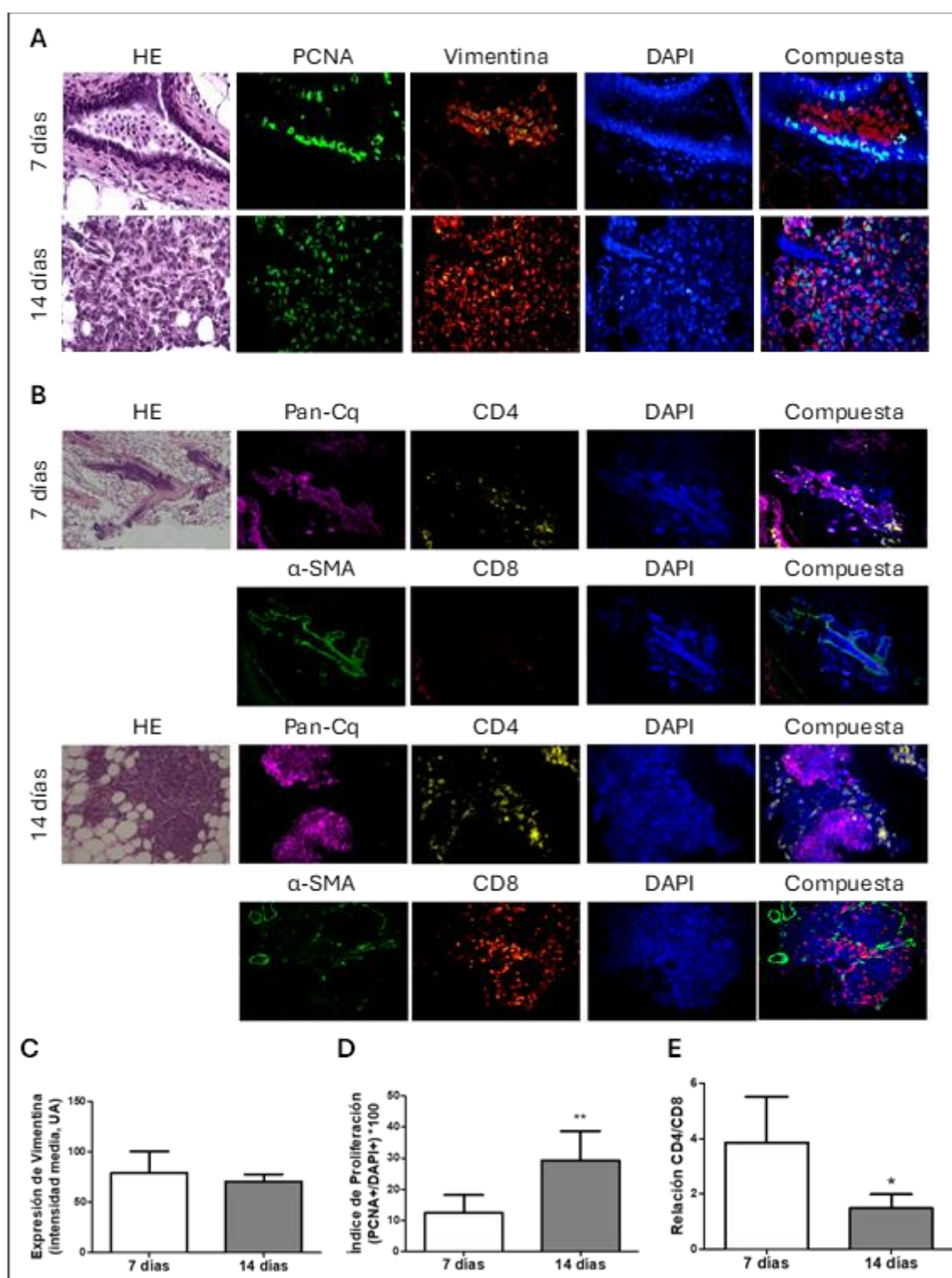


Figura 23. Caracterización del modelo intraductal 4T1 en ratones BALB/c. Marcación por inmunofluorescencia en cortes de glándulas mamarias de ratones BALB/c 7 o 14 días post-inoculación intraductal de células 4T1. **A:** Micrografías representativas de tinción para el marcador de proliferación PCNA (verde) y el marcador mesenquimal vimentina (rojo) con DAPI para identificar núcleos (azul), magnificación 200x. **B:** Micrografías representativas de marcación para CD4 (amarillo), CD8 (rojo, pan-Cq (rosa) y α -SMA

(verde) con DAPI para identificar núcleos (azul), magnificación 200x. **C:** Índice de proliferación calculado como porcentaje de área con marca para PCNA sobre el área marcada con DAPI, se muestran media y error estándar de dos experimentos independientes, $**p<0.01$. **D:** Relación entre cantidad de células con marca para CD4 y CD8, se muestran media y error estándar de dos experimentos independientes, $*p<0.05$.

4.12.3 T2 reduce la capacidad invasiva de las células 4T1 en el modelo intraductal

Ratones BALB/c fueron inoculados intraductalmente con 15000 células 4T1 y 48 horas después se inició el tratamiento con T2, empleándose el mismo esquema utilizado para los ensayos *in vivo* con tumores subcutáneos (5 dosis de 25 mg/kg administradas intraperitonealmente día por medio). A los 14 días post-inoculación, los ratones fueron sacrificados y sus mamas extraídas para realizar el *wholemout*, la inclusión en parafina y los análisis histológico y por inmunofluorescencia.

Tal como se ilustra en la Figura 24, no se observaron diferencias apreciables entre las glándulas tratadas con T2 y las glándulas control mediante la técnica de *wholemout*. Sin embargo, al realizar el recuento de ductos en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, se encontró que las mamas de ratones tratados con T2 poseían una proporción menor de ductos con carcinomas invasores respecto de las glándulas de los ratones control ($13\pm1\%$ vs $20\pm3\%$ respectivamente, $p<0,05$).

Mediante la técnica de inmunofluorescencia con anti-PCNA se observó una reducción significativa en la proporción de células tumorales proliferantes: $43\pm4\%$ en los cortes de ratones control vs. $27\pm6\%$ en los ratones tratados con T2, $p<0.05$ (Figura 25B). No se observó diferencia significativa en la expresión de vimentina (Figura 25C).

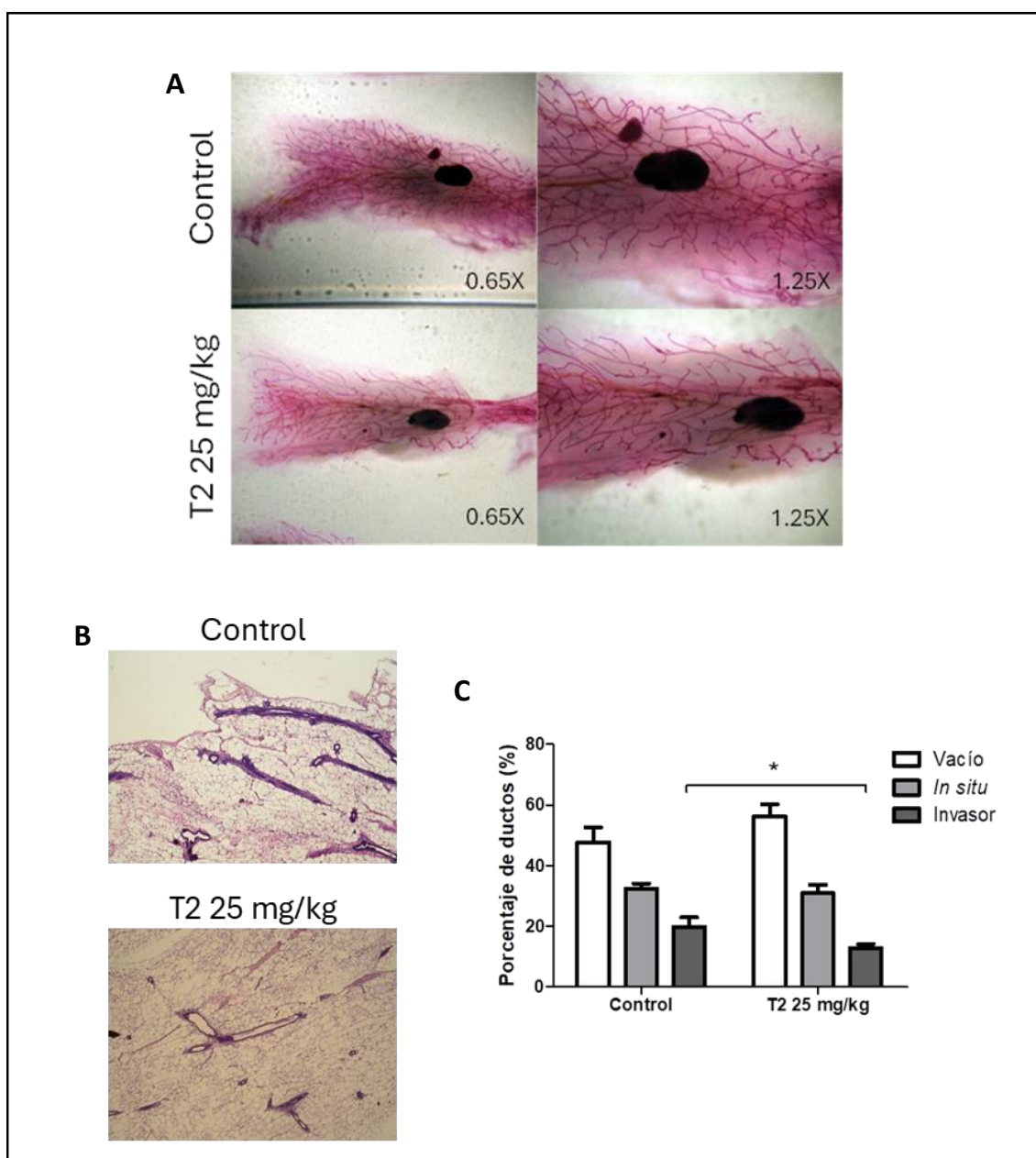


Figura 24. El tratamiento con T2 *in vivo* reduce la capacidad invasiva de células 4T1 inoculadas intaductalmente en ratones BALB/c. **A:** *Wholemout* de las mamas de ratones BALB/c extraídas 14 días después de haber inoculado 15000 células 4T1 y de haber tratado con cinco dosis intraperitoneales de vehículo (control) o T2 25 mg/kg, imágenes obtenidas bajo lupa estereoscópica. **B:** Micrografías representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los cortes obtenidos al incluir las glándulas en parafina (magnificación 40x). **C:** Recuento de estado de los ductos (vacíos, con crecimiento celular *in situ* o invasor) observados en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se muestran media y error estándar de un experimento, * $p < 0.05$.

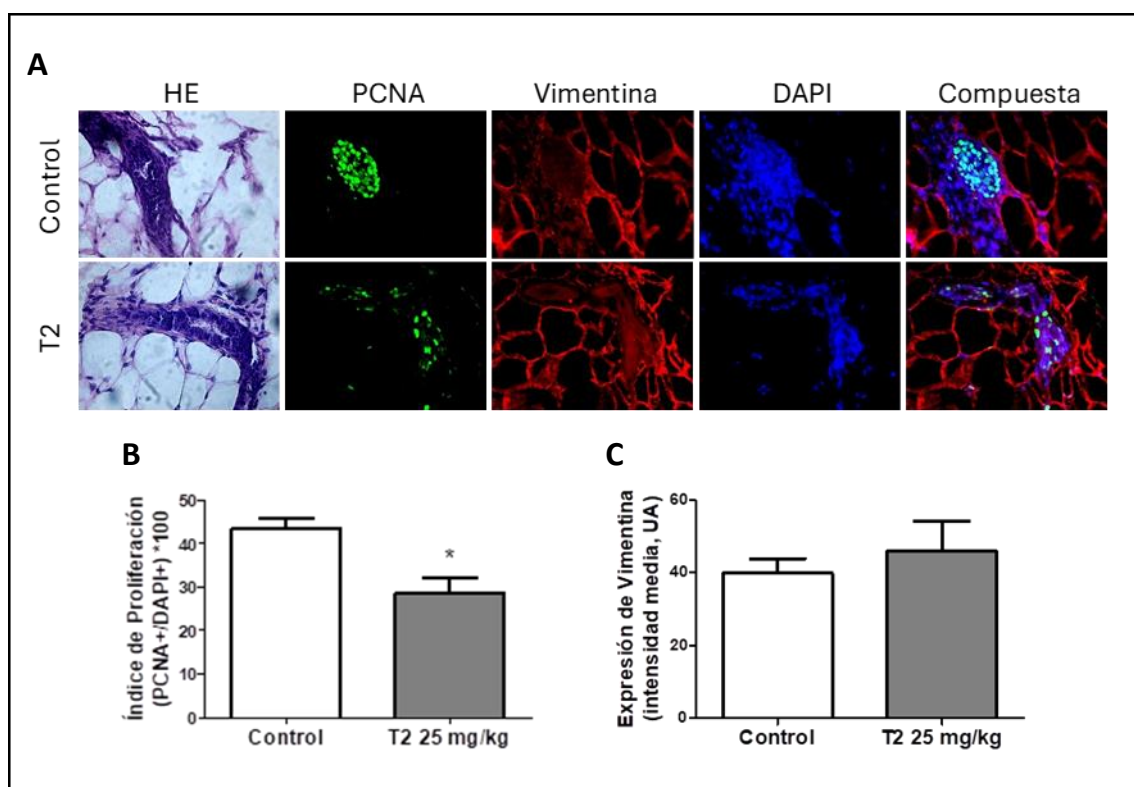


Figura 25. El tratamiento con T2 *in vivo* disminuye la proliferación de células 4T1 inoculadas intraductalmente en ratones BALB/c. A: Inmunofluorescencia para PCNA (verde) y vimentina (rojo) con DAP (azul) para marca nuclear sobre cortes de glándulas mamarias de ratones inoculados con células 4T1 y tratados con T2 25 mg/kg o vehículo, 400x. **B:** Índice de proliferación calculado como porcentaje de área con marca para PCNA sobre el área marcada con DAPI, se muestran media y error estándar, * $p < 0.05$. **C:** Cuantificación de expresión de vimentina.

4.12.4 T2 reduce la expresión de β -catenina de las células 4T1 en el modelo intraductal

Considerando la modulación de la vía Wnt- β -catenina observada *in vitro*, se evaluó la expresión de β -catenina mediante inmunofluorescencia en los cortes de las glándulas. En primera instancia, se observó un patrón de expresión diferencial entre células que se encontraban en focos de crecimiento *in situ* y en focos tumorales invasores, estando β -catenina acumulada principalmente en la membrana celular de los primeros y con una marca menos localizada en los segundos (Figura 26). La cuantificación de fluorescencia mostró una expresión significativamente mayor en las glándulas de ratones control con respecto a los

tratados con T2 tanto en focos *in situ* (60 ± 1 UA vs. 36 ± 6 UA, $p < 0,01$) como invasores (44 ± 8 UA vs. 20 ± 4 UA, $p < 0,05$).

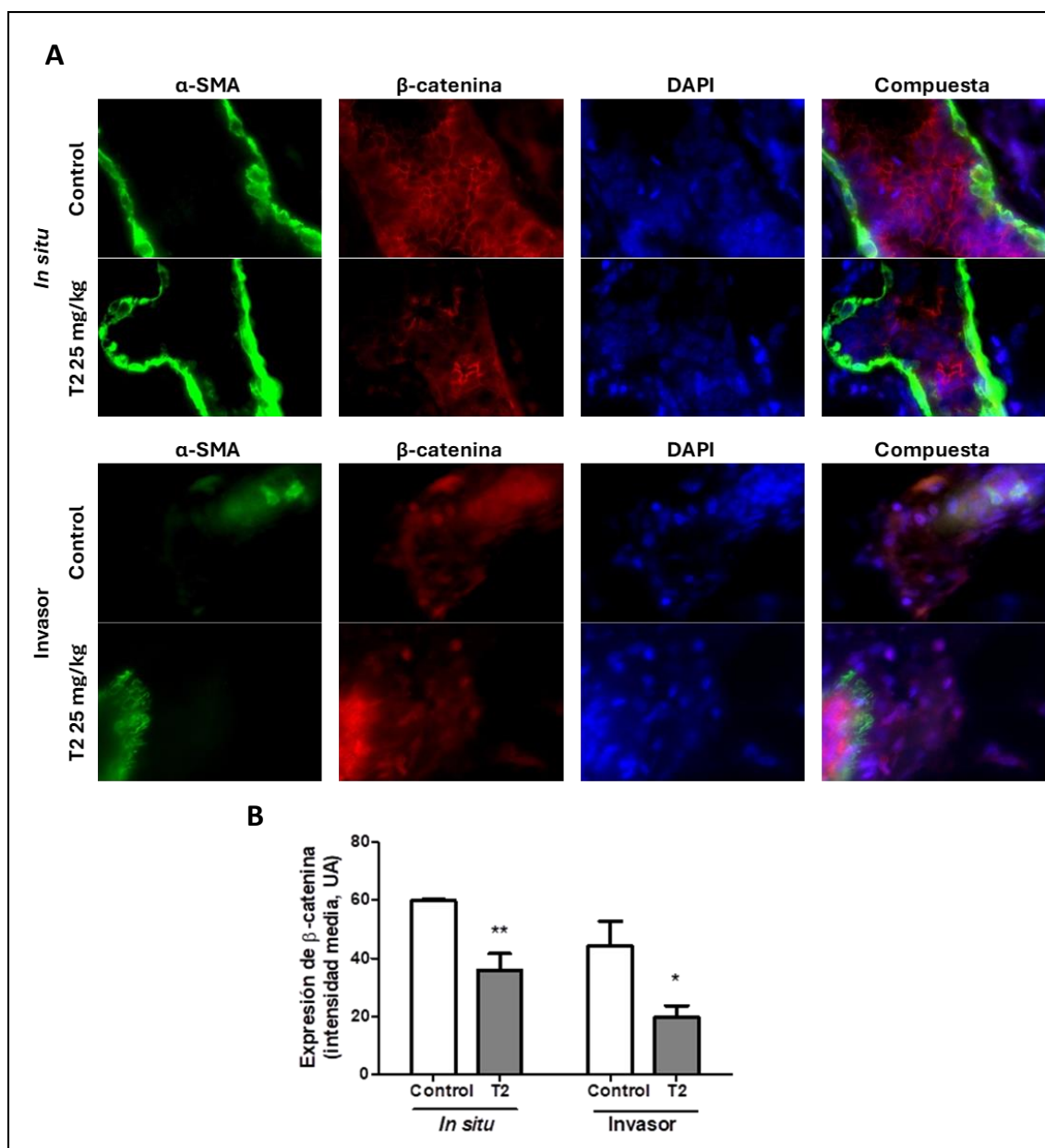


Figura 26. El tratamiento con T2 *in vivo* disminuye la expresión de β -catenina de células 4T1 inoculadas intraductalmente en ratones BALB/c. A: Imágenes representativas de inmunofluorescencia para α -SMA (verde) y β -catenina (rojo) con DAPI (azul) para marca nuclear realizada sobre cortes de glándulas mamarias de ratones inoculados con células 4T1 y tratado con T2 25 mg/kg o vehículo. Para cada condición se muestran un campo de células 4T1 *in situ* y un campo de células 4T1 que invadieron el estroma glandular, 1000X. **B:** Cuantificación de A, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

5

Discusión

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (Bray *et al.*, 2024), siendo su presentación más agresiva el subtipo triple negativo (Qiu *et al.*, 2016). La ausencia de marcadores de membrana específicos reduce las opciones terapéuticas disponibles por lo que resulta de gran interés el desarrollo de nuevos tratamientos que resulten efectivos para esta patología.

Las TSCs son compuestos ampliamente estudiados desde hace décadas para el tratamiento de distintas enfermedades debido, en gran parte, a su capacidad de formar complejos con cationes metálicos. Más allá de ser agentes quelantes, los complejos TSC-metal pueden participar en la formación de especies reactivas del oxígeno causando estrés oxidativo. Además, la sustracción de cationes metálicos del medio celular resulta en la inhibición de enzimas que dependen de los mismos para ser funcionales, encontrándose entre ellas, enzimas asociadas a la duplicación del ADN, un proceso exacerbado en las células tumorales. Un ejemplo es la ribonucleótido reductasa, enzima responsable de la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos y uno de los blancos principales de regulación durante la síntesis de dNTPs cuya actividad puede ser inhibida por algunas TSCs (Kalinowski *et al.*, 2009).

Por estos motivos, varias TSCs han sido sintetizadas y probadas en el campo oncológico, algunas de las cuales han sido incluidas en ensayos clínicos (de Siqueira *et al.*, 2019).

Sin embargo, los mecanismos de acción de las TSCs no están completamente descriptos. Ha sido postulado que ingresarían a las células por difusión a través de la membrana plasmática por lo que es crucial que tengan un buen balance lipohidrofílico (Lovejoy y Richardson, 2002; Whitnall *et al.*, 2006). Dos formas de lograr este balance son la formación de complejos de TSC con un metal o por la adición de diversos sustituyentes, tanto en el anillo aromático del

núcleo indánico como en la función tiosemicarbazona propiamente dicha (Bai *et al.*, 2022).

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que T2, una TSC derivada de 1-indanona con sustitución arílica en el nitrógeno 4 (N^4), posee efecto citotóxico sobre varias líneas de cáncer de mama de origen humano con diferente expresión de receptores hormonales. Este efecto estuvo acompañado por un aumento en la formación de ROS, muerte celular por apoptosis y reducción del compartimento de CSCs (Sólino *et al.*, 2018). Considerando que dentro de las líneas celulares sensibles a T2 se encontraba la línea triple negativa MDA-MB-231 y dadas la agresividad y las limitadas opciones terapéuticas que presenta el subtipo triple negativo, decidimos avanzar con células de este subtipo.

En una primera instancia evaluamos el efecto citotóxico de T2 sobre otras tres líneas de CMTN, la línea humana HCC70 y las líneas murinas 4T1 y LM-38 LP, obteniendo curvas dosis-respuesta similares entre sí y similares a lo previamente reportado para MDA-MB-231. Considerando los objetivos planteados, elegimos continuar con la línea celular 4T1 y demostramos que, al igual que en las células MDA-MB-231, T2 induce muerte por apoptosis.

Uno de los *hallmarks* del cáncer es la inhibición de la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011), siendo la apoptosis una de estas formas de muerte. Se conoce que los miembros de la familia de Bcl-2 son reguladores clave de este proceso (Adams y Cory, 2007). Entre los inhibidores apoptóticos pertenecientes a la familia Bcl-2 se encuentra Bcl-xL, proteína cuya expresión vimos disminuida al tratar con T2. Asimismo, encontramos aumentadas las formas clivadas de PARP y caspasa 3, indicadoras de este tipo de muerte celular, confirmando que T2 induciría la muerte celular mediante apoptosis.

Otros procesos biológicos fundamentales para la progresión tumoral son la clonogenicidad o capacidad de las células para proliferar y formar colonias, así como también los fenómenos de migración e invasión, fundamentales en el

proceso metastásico. Los resultados presentados demuestran que T2 afecta negativamente estas tres características de las células tumorales 4T1 incluso en un modelo experimental *ex vivo* como el de metástasis pulmonares por inoculación intravenosa de células tratadas con T2.

Las metaloproteasas de matriz son endopeptidasas que participan en los procesos de remodelación de la matriz extracelular tanto fisiológicos como patológicos. En el cáncer, son actores clave dentro de los procesos de invasión, metástasis y angiogénesis (Gialeli *et al.*, 2011) y en CMTN es especialmente relevante la participación de MMP-9 (Mehner *et al.*, 2014; Yousef *et al.*, 2014). Al analizar la acción de T2 sobre la actividad de MMP-9, observamos su reducción significativa después del tratamiento.

Ha sido postulado que las CSCs, la población de células pluripotentes con capacidad iniciadora de tumores, serían responsables de recidivas y metástasis. Una de sus características distintivas es la posibilidad de entrar en un estado quiescente y, dado que la mayoría de las terapias antitumorales convencionales están dirigidas a células con alta tasa de proliferación, las CSCs resistirían al tratamiento dando lugar a la progresión o reaparición de la enfermedad. Es por esto que la modulación de esta población es un objetivo ampliamente buscado en el desarrollo de nuevas terapias (Bai *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2021).

A lo largo de los años se han descrito distintos marcadores de CSC. Estos marcadores varían según el organismo y tejido de origen. Así es que, en ratones, las CSCs de mama suelen ser positivas para el antígeno termoestable CD24 mientras que en humanos son CD24 (-/bajo) (Bai *et al.*, 2018; Hsu *et al.*, 2018). Shackleton y colaboradores (2006) establecieron la marca conjunta Lin(-)/CD24(+)/CD29(alto) para identificar células *stem* mamarias murinas.

En esta tesis, el efecto de T2 sobre el compartimento de células *stem* fue ampliamente demostrado a través de la reducción en la proporción de células con marcadores de superficie característicos de CSCs evaluados por citometría de

flujo, la baja en la expresión de genes asociados a la pluripotencialidad y la reducción tanto en número como diámetro de esferas formadas en condiciones de *anoikis* que pueden asociarse con la cantidad de células pluripotenciales y su capacidad autorrenovativa respectivamente. Esto sugiere que las células CSC serían un posible blanco terapéutico de T2.

Debido a su estructura, las TSCs suelen actuar como quelantes de metales, especialmente de hierro. Entre las proteínas reguladas por la disminución de hierro intracelular, se encuentra NDRG1 (Le y Richardson, 2004). Hay reportes opuestos sobre el rol de NDRG1 en distintos tipos de cáncer, posicionándolo como una proteína que suprime o favorece las metástasis y la progresión tumoral (Joshi *et al.*, 2022). En cáncer de mama, la bibliografía apunta hacia un perfil más bien supresor dado por la inhibición de la TEM mediante la regulación de las vías de señalización de TGF- β y Wnt, esta última mediante su interacción con el receptor LRP6 (Zhao y Richardson, 2023). Asimismo, la participación de NDRG1 en la acción de otras TSCs no sólo ha sido probada, sino que ha sido demostrada como esencial para el efecto antimetastásico de la TSC Dp44mT (Liu *et al.*, 2012).

Hay reportes de su regulación tanto a nivel de transcripción como de traducción (Ghafouri-Fard *et al.*, 2023). En los resultados presentados, demostramos que el tratamiento con T2 resulta en un aumento de NDRG1 que estaría ocurriendo a nivel post-transcripcional.

Los micro ARNs (miRNA) son secuencias no codificantes de 20 a 24 nucleótidos que participan en la regulación ARNm reprimiendo su traducción y/o induciendo su degradación, siendo frecuentes las alteraciones en su expresión en el contexto oncológico (Catalanotto *et al.*, 2016; Jansson y Lund, 2012). Estas moléculas cumplen una función represora que puede darse por inhibición de la traducción o por degradación del ARNm dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y su blanco (MacFarlane y R.Murphy, 2010). Entre los miRNA de expresión alterada en cáncer de mama se encuentran miR-

182-5p y miR-200c (Chen *et al.*, 2012; Mulrane *et al.*, 2013). La secuencia de miR-182-5p lo convierte en un inhibidor de la expresión de NDRG1, capaz de unirse a la región 3'UTR de su mensajero (Liu *et al.*, 2013) mientras que miR-200c ha sido vinculado a la inhibición/reversión de TEM a través de la modulación de ZEB1, factor cuya expresión también es inhibida por NDRG1 (Gregory *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2019).

Además de regular a NDRG1, miR-182-5p tiene un rol importante en la tumorigénesis, la proliferación, la invasión y la metástasis en cáncer de mama, siendo particularmente relevante en el subtipo triple negativo (Sameti *et al.*, 2023). Su expresión es positivamente regulada por β -catenina nuclear y lleva a la disminución en la expresión de RECK (Chiang *et al.*, 2013), una glicoproteína que inhibe la acción de algunas metaloproteasas de matriz, entre ellas la MMP-9 (Takagi *et al.*, 2009) cuya actividad fue afectada por el tratamiento con T2. Otros *targets* directos de este miRNA son PTEN, FOXO1, ZFP36 y FOXF2 que participan en procesos de proliferación, apoptosis, invasión, migración y regulación del metabolismo celular (Sameti *et al.*, 2023).

El miR-200c es considerado un inhibidor de la TEM o inductor de un proceso de transición mesenquimal-epitelial. Su expresión resulta en la inhibición de proteínas como ZEB1, ZEB2, Smad2, Smad5, Snail y Slug que forman complejos represores de la transcripción de genes epiteliales como E-cadherina y claudinas (Perdigão-Henriques *et al.*, 2016). Además, ZEB1 regula la expresión de miR-200c, estableciendo un *loop* de represión recíproca (Burk *et al.*, 2008).

Implementando la técnica de *Stem Loop* PCR evaluamos la expresión de estos dos miRNA luego del tratamiento con T2, encontrando una regulación inversa mediada por T2: mientras la expresión de miR-200c aumentó, la expresión de miR-182-5p se vio reducida. Estos resultados sugerirían la participación de ambos miRNA en los efectos mediados por T2. Estudios

complementarios con miRNA *inhibitor* y *mimic* confirmarían la regulación post transcripcional ejercida por miR-182-5p sobre NDRG1.

Dentro de las múltiples vías de acción reportadas para NDRG1 se destaca la inhibición de la TEM asociada a la modulación de la vía de señalización de Wnt- β -catenina (Chekmarev *et al.*, 2021). Con nuestros resultados, pudimos establecer el cambio de las células 4T1 hacia un fenotipo más epitelial a través de la expresión de diversos marcadores tanto a nivel de proteína como ARNm, así como la reorganización de los filamentos de actina hacia una disposición cortical característica de células epiteliales. La variación en la expresión de genes blanco de la vía Wnt- β -catenina en conjunto con el ensayo de gen reportero nos permite adjudicar parte de los efectos de T2 sobre el fenotipo celular a la regulación de esta vía.

Además, la vía de Wnt está ligada al mantenimiento de la población de CSCs. Sea en tejido normal o tumoral, la señalización de Wnt- β -catenina tiene un rol prominente en la regulación y el sostenimiento de la autorrenovación y pluripotencialidad celular, así como en la determinación de su diferenciación (Abreu de Oliveira *et al.*, 2022). En este contexto, Lamb y colaboradores han asociado la capacidad celular de sobrevivir en suspensión y formar esferas con una señalización de Wnt activa tanto en líneas celulares de cáncer de mama humanas como muestras de pacientes con enfermedad metastásica (Lamb *et al.*, 2013).

En la misma línea, hay evidencia vinculando a la TEM con la adquisición de propiedades *stem* en CSCs a través de la regulación de la señalización de Wnt. Entre los productos de la vía de señalización activa se encuentran el factor de transcripción Snail que, inducido por el proceso de TEM, confiere características *stem* a las células tumorales y la molécula de adhesión CD44 cuyo rol en la promoción de CSCs ha sido demostrado tanto para la vía canónica de Wnt como para las no canónicas. Asimismo, existe evidencia que vincula elevados niveles de

β -catenina en modelos de CMTN con aumentos en marcadores de pluripotencialidad y resistencia a quimioterapia (Abreu de Oliveira *et al.*, 2021, 2022).

Nuestros resultados coinciden con estas observaciones sobre el vínculo entre Wnt y CSCs, considerando que la disminución de la población *stem* luego del tratamiento con T2 se vio acompañada por inhibición de la vía de Wnt con reducción en la expresión de Snail y CD44.

Uno de los factores del tipo TCF que intervienen en la vía de Wnt es TCF-8. También llamado ZEB1, es considerado un regulador crítico de la plasticidad celular, la respuesta al daño del ADN, la proliferación y la diferenciación. Su expresión es activada por las vías de Wnt, TGF- β y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y reprimida por los miRNA de la familia 200. La expresión de ZEB1 disminuyó al tratar con T2 al igual que algunos de los blancos que este induce, entre ellos Sox-2 que interviene en el mantenimiento de las CSC, y los marcadores de la TEM Snail y Twist. Además, T2 aumentó la expresión de sus blancos de represión E-cadherina y miR-200c (Drápela *et al.*, 2020).

Dado los alentadores resultados obtenidos *in vitro*, resultó indispensable ver si los efectos de T2 observados en células *in vitro* se reproducían en un modelo *in vivo*.

Los ratones no sólo mostraron una buena tolerancia a la administración intraperitoneal de T2, sino que el tratamiento redujo tanto el peso del tumor a tiempo final como la cantidad de metástasis pulmonares superficiales en el modelo 4T1 que se caracteriza por su agresividad. Esto se vio acompañado por una menor invasión del tumor hacia la cavidad peritoneal. Además, histológicamente, los tumores tratados con T2 mostraron diferenciación hacia un fenotipo más epitelial con bordes definidos, fibras de colágeno organizadas y menor índice mitótico. Estos resultados concuerdan con el efecto sobre TEM y capacidades invasiva y metastásica observados *in vitro*.

Una limitante del modelo subcutáneo es que las células tumorales inoculadas no están en contacto con el tejido correspondiente en un contexto fisiológico. Considerando esto junto con los resultados expuestos sobre los efectos de T2 relacionados con la capacidad invasiva de las células 4T1, resultó interesante la evaluación del tratamiento con esta TSC en un modelo de inoculación intraductal.

Este modelo permite estudiar la transición de los tumores *in situ* a invasores siendo necesaria una puesta a punto precisa para poder observar este fenómeno, especialmente en células caracterizadas por su rápido crecimiento e invasión como la línea 4T1.

Con la inoculación de 15000 células y un tiempo final de dos semanas, logramos establecer un modelo que permitiera encontrar focos de invasión tumoral sin llegar a formar tumores que comprometieran la integridad de la glándula mamaria. Además, el tiempo ensayado fue suficiente para el establecimiento de un infiltrado inflamatorio con una evolución de la relación entre linfocitos T *helper* (CD4+) y citotóxicos (CD8+) acorde a lo previamente descrito por Steenbrugge y colaboradores (2019).

La inoculación de células de CMTN en los conductos de la glándula mamaria a través del pezón proporciona el microambiente real de una glándula mamaria y probablemente se parezca más a lo que ocurre durante el desarrollo de un tumor de mama humano. En el modelo previamente descrito por Ghosh y colaboradores (Ghosh et al, 2018), también se encontraron estructuras similares a un carcinoma *in situ* en los ductos una semana después de la inyección de 50000 células 4T1 que posteriormente progresaron hasta convertirse en tumores primarios que invadieron los ductos, los lóbulos y el estroma en una progresión similar a la esperada para un cáncer de mama humano originado en el epitelio ductal.

Nuestros resultados demostraron que, una vez establecidos focos tumorales *in situ*, se dieron dos eventos que promovieron la invasión local: el aumento del índice de proliferación de las células tumorales y la disrupción de la barrera que representan las células mioepiteliales que rodean los ductos (identificadas por su marca positiva para α -SMA).

En este marco de dos semanas fue posible aplicar el mismo esquema de tratamiento con T2 utilizado en el modelo subcutáneo, empleando T2 en una concentración de 25 mg/kg. Este tratamiento resultó en una significativamente menor proporción de focos de invasión de células tumorales desde el lumen ductal hacia el estroma glandular acompañado por una menor tasa de proliferación y la modulación de la expresión de β -catenina.

La localización predominante de β -catenina en membrana celular cuando las células 4T1 se encontraron dentro del ducto coincide con lo reportado por otros autores en experimentos *in vitro* con esta línea celular (Cai *et al.*, 2013; Godinho-Pereira *et al.*, 2022) mientras que la pérdida de esta marca intensa en favor de una marca más difusa en núcleo y citoplasma corresponde con lo esperado en células que fueron capaces de atravesar la pared del ducto mamario. La señal de β -catenina detectada tiende a ser más intensa en focos *in situ* que en invasores. Esto puede deberse a que más allá de participar en uniones intercelulares, la β -catenina secuestrada en membrana actúa como reservorio, siendo liberada al citoplasma y pudiendo translocarse al núcleo una vez disminuida o perdida la expresión de E-cadherina como ocurre durante el proceso de invasión (Gayrard *et al.*, 2018). Estos resultados coinciden con la participación de β -catenina en la acción de T2 observada *in vitro*.

Con estos resultados, proponemos que los efectos de T2 sobre la TEM podrían seguir el mecanismo esquematizado en la Figura 27, donde T2 induciría la expresión de NDRG1, presumiblemente por la depleción del hierro celular. De esta manera, NDRG1 inhibiría la activación de la vía de Wnt debido a su

interacción con el receptor LRP6. Consecuentemente, β -catenina no se podría translocar al núcleo para ejercer su rol en la transcripción de genes asociados a la TEM entre los que se encuentra ZEB1. Finalmente, esta modulación resultaría en la inhibición de la TEM lo que se vio experimentalmente reflejada en el aumento de la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y la disminución de marcadores mesenquimales como Twist, Snail y vimentina, siendo los miR 182-5p y 200c partícipes de esta regulación. Este mecanismo cuyo resultado final sería la regulación negativa de los procesos de invasión y metástasis tumoral contribuiría a la acción antitumoral mediada por el fenómeno de apoptosis inducido por el aumento de especies reactivas del oxígeno previamente descrito para este compuesto.

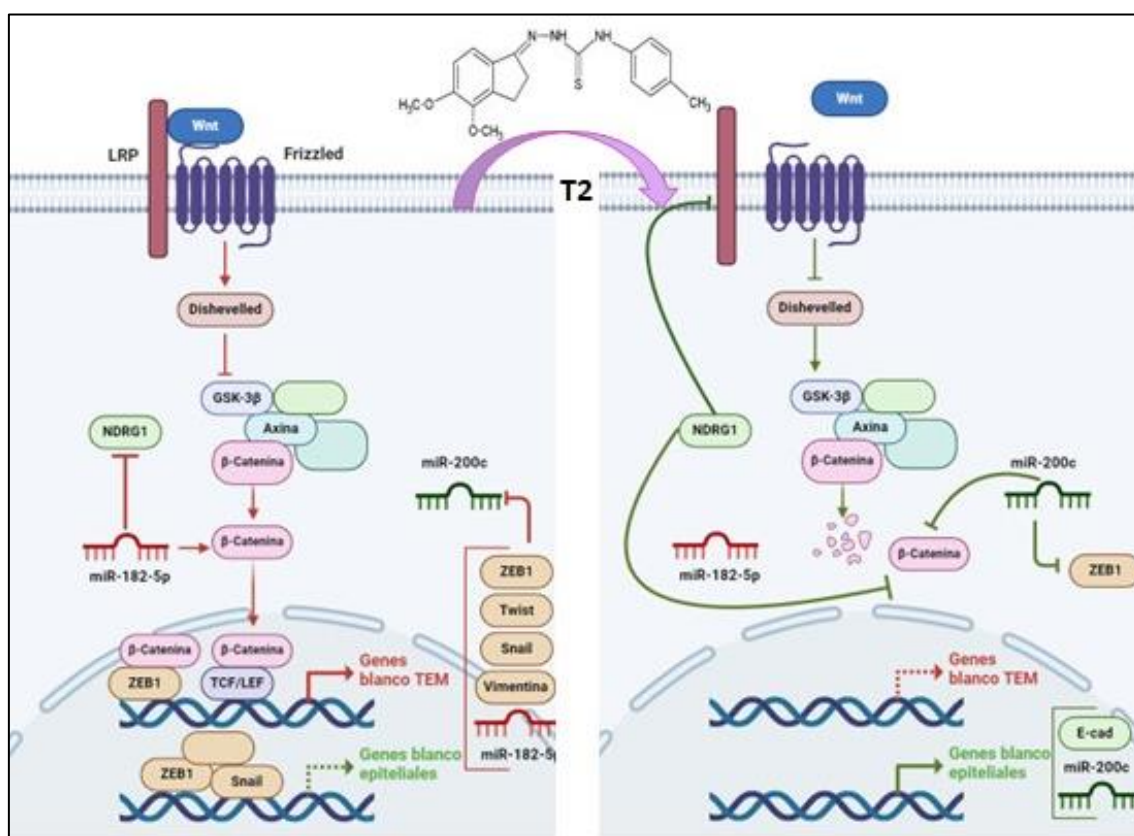


Figura 27. Mecanismo de acción propuesto para T2.

6

Conclusión

En la presente tesis doctoral demostramos que la tiosemicarbazona T2 ejerce una acción citotóxica sobre la línea de cáncer de mama triple negativo murino 4T1 y afecta no solo sus capacidades clonogénica, migratoria e invasiva, sino que también tiene un efecto inhibitorio sobre su componente *stem*.

La modulación de diferentes moléculas ejercida por T2 sugiere un mecanismo en el cual intervendrían NDRG1, miR-182-5p y miR-200c induciendo una reversión de la TEM a través de la vía de señalización Wnt- β -catenina modulando la expresión de ZEB1.

Los resultados *in vivo* mostraron una reducción significativa de la masa tumoral, de la invasión y de la metástasis en los tumores subcutáneos y la disminución de focos de invasión en el modelo intraductal.

Estos resultados sugieren que T2 podría ser considerada para futuros estudios como terapia alternativa y/o complementaria en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.



Bibliografía

- Adams, J. M., y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Abreu de Oliveira WA, Moens S, El Laithy Y, van der Veer BK, Athanasouli P, Cortesi EE, Baietti MF, Koh KP, Ventura J-J, Amant F, Annibali D and Lluís F (2021) Wnt/ β -Catenin Inhibition Disrupts Carboplatin Resistance in Isogenic Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* 11:705384. doi: 10.3389/fonc.2021.705384
- Abreu de Oliveira WA, El Laithy Y, Bruna A, Annibali D, Lluís F (2022). Wnt Signaling in the Breast: From Development to Disease. *Front Cell Dev Biol.* doi: 10.3389/fcell.2022.884467.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 834–846. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>
- Atiya, H. I., Dvorkin-Gheva, A., Hassell, J., Patel, S., Parker, R. L., Hartstone-Rose, A., Hodge, J., Fan, D., Y Ramsdell, A. F. (2019). Intraductal Adaptation of the 4T1 Mouse Model of Breast Cancer Reveals Effects of the Epithelial Microenvironment on Tumor Progression and Metastasis. *Anticancer Research*, 39(5), 2277–2287. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13344>
- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., y Li, Y. (2018). Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 69, 152–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.004>
- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., y Li, Y. (2021). Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? *Cancer Letters*, 497, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.016>
- Bai, X.-G., Zheng, Y., y Qi, J. (2022). Advances in thiosemicarbazone metal complexes as anti-lung cancer agents. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1018951>
- Bandyopadhyay, S., Pai, S. K., Gross, S. C., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Saito, K., Commes, T., Hayashi, S., Watabe, M., y Watabe, K. (2003). The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Research*, 63(8), 1731–1736.
- Bandyopadhyay, S., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., Takano, Y., Saito, K., Piquemal, D., Commes, T., Watabe, M., Gross, S. C., Wang, Y., Ran, S., y Watabe, K. (2004). Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene*, 23(33), 5675–5681. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1207734>
- Bartucci, M., Svensson, S., Romania, P., Dattilo, R., Patrizii, M., Signore, M., Navarra, S., Lotti, F., Biffoni, M., Pilozi, E., Duranti, E., Martinelli, S., Rinaldo, C., Zeuner, A., Maugeri-Saccà, M., Eramo, A., y De Maria, R. (2012). Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), 768–778. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.170>
- Beaber, E. F., Buist, D. S. M., Barlow, W. E., Malone, K. E., Reed, S. D., y Li, C. I. (2014). Recent Oral Contraceptive Use by Formulation and Breast Cancer Risk among Women 20 to 49 Years of Age. *Cancer Research*, 74(15), 4078–4089. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3400>
- Begicevic, R.-R., y Falasca, M. (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>

- Behbod, F., Kittrell, F. S., LaMarca, H., Edwards, D., Kerbawy, S., Heestand, J. C., Young, E., Mukhopadhyay, P., Yeh, H.-W., Allred, D. C., Hu, M., Polyak, K., Rosen, J. M., y Medina, D. (2009). An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Research*, 11(5), R66. <https://doi.org/10.1186/bcr2358>
- Bergin, A. R. T., y Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research*, 8, 1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Bharti, N., Shailendra, Sharma, S., Naqvi, F., y Azam, A. (2003). New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and In vitro anti-Amoebic activity. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 11(13), 2923–2929. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00213-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00213-X)
- Blanz Jr., E. J., y French, F. A. (1968). The Carcinostatic Activity of 5-Hydroxy-2-formylpyridine Thiosemicarbazone1. *Cancer Research*, 28(12), 2419–2422.
- Bombonati, A., y Sgroi, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of Pathology*, 223(2), 308–318. <https://doi.org/10.1002/path.2808>
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., y Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., y Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brockman, R. W., Thomson, J. R., Bell, M. J., Y Skipper, H. E. (1956). Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Research*, 16(2), 167–170.
- Brunner, T. B., Kunz-Schughart, L. A., Grosse-Gehling, P., y Baumann, M. (2012). Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology*, 22(2), 151–174. <https://doi.org/10.1016/J.SEMRADONC.2011.12.003>
- Bumaschny, V., Urtreger, A., Diamant, M., Krasnapolski, M., Fiszman, G., Klein, S., y Joffé, E. B. de K. (2004). Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model. *Breast Cancer Research*, 6(2). <https://doi.org/10.1186/bcr757>
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., y Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Reports*, 9(6), 582–589. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.74>
- Cadigan, K. M., y Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a007906–a007906. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>

- Cai, J., Guan, H., Fang, L., Yang, Y., Zhu, X., Yuan, J., Wu, J., y Li, M. (2013). MicroRNA-374a activates Wnt/ β -catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 566–579. <https://doi.org/10.1172/JCI65871>
- Cancer Today. (n.d.). Retrieved May 22, 2023, from <https://gco.iarc.fr/today/about#references>
- Cangul, H. (2004). Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genetics*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-27>
- Caputto, M. E., Fabian, L. E., Benítez, D., Merlino, A., Ríos, N., Cerecetto, H., Moltrasio, G. Y., Moglioni, A. G., González, M., y Finkielstein, L. M. (2011). Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 19(22), 6818–6826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.037>
- Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., y Zackrisson, S. (2019). Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †. *Triple-Negative Breast Cancer - Clinical Results and Biomarker Analysis of GeparNuevo Study*, 30, 1194–1220. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173>
- Cardoso, F., Spence, D., Mertz, S., Corneliussen-James, D., Sabelko, K., Gralow, J., Cardoso, M.-J., Peccatori, F., Paonessa, D., Benares, A., Sakurai, N., Beishon, M., Barker, S.-J., y Mayer, M. (2018). Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: Decade report (2005–2015). *The Breast*, 39, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2018.03.002>
- Carvalho, C. S., y de Melo, E. J. T. (2009). Anti-parasitic action and elimination of intracellular Toxoplasma gondii in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(2), 139–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000038>
- Casas, J. S., García-Tasende, M. S., y Sordo, J. (2000). Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Reviews*, 209(1), 197–261. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)00363-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00363-5)
- Catalanotto, C., Cogoni, C., y Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Chattopadhyay, D., Mazumdar, S. K., Banerjee, T., y Sheldrick, W. S. (1989). Structure of 1-(3,4-dichlorophenyl)-4-methylthiosemicarbazide. *Acta Crystallographica Section C*, 45(2), 314–317. <https://doi.org/10.1107/S0108270188009977>
- Chekmarev, J., Azad, M. G., y Richardson, D. R. (2021). The Oncogenic Signaling Disruptor, NDRG1: Molecular and Cellular Mechanisms of Activity. *Cells*, 10(9), 2382. <https://doi.org/10.3390/cells10092382>
- Chen, J., Tian, W., Cai, H., He, H., y Deng, Y. (2012). Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. *Medical Oncology*, 29(4), 2527–2534. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0117-4>
- Chen, X., Li, J., Gray, W. H., Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Shyr, Y., y Pietenpol, J. A. (2012). TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Informatics*, 11, CIN.S9983. <https://doi.org/10.4137/CIN.S9983>

- Chiang, C.-H., Hou, M.-F., y Hung, W.-C. (2013). Up-regulation of miR-182 by β -catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(4), 3067–3076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.009>
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., y van Roy, F. (2001). The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Molecular Cell*, 7(6), 1267–1278. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00260-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00260-X)
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., y Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207–212. <https://doi.org/10.3727/095535491820873191>
- Costabile, V., Duraturo, F., Delrio, P., Rega, D., Pace, U., Liccario, R., Rossi, G. B., Genesio, R., Nitsch, L., Izzo, P., Y De Rosa, M. (2015). Lithium chloride induces mesenchymal-to-epithelial reverting transition in primary colon cancer cell cultures. *International Journal of Oncology*, 46(5), 1913–1923. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2911>
- Crocker, A. K., y Allan, A. L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH^{hi}CD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/S10549-011-1692-Y>
- D'Agostino, I., Mathew, G. E., Angelini, P., Venanzoni, R., Angeles Flores, G., Angeli, A., Carradori, S., Marinacci, B., Menghini, L., Abdelgawad, M. A., Ghoneim, M. M., Mathew, B., y Supuran, C. T. (2022). Biological investigation of *N*-methyl thiosemicarbazones as antimicrobial agents and bacterial carbonic anhydrases inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 986–993. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2055009>
- de Siqueira, L. R. P., de Moraes Gomes, P. A. T., de Lima Ferreira, L. P., de Melo Rêgo, M. J. B., y Leite, A. C. L. (2019). Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 170, 237–260. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.024>
- De Sousa e Melo, F., y Vermeulen, L. (2016). Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology. *Cancers*, 8(7), 60. <https://doi.org/10.3390/cancers8070060>
- DeConti, R. C., Toftness, B. R., Agrawal, K. C., Tomchick, R., Mead, J. A. R., Bertino, J. R., Sartorelli, A. C., y Creasey, W. A. (1972). Clinical and Pharmacological Studies with 5-Hydroxy-2-formylpyridine Thiosemicarbazone. *Cancer Research*, 32(7), 1455–1462.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., y Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M. J., Wapnir, I., Dirbas, F. M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S. K., ... Clarke, M. F. (2009). Association of reactive oxygen species levels and

- radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458(7239), 780–783. <https://doi.org/10.1038/nature07733>
- Dixon K, Lui G, Z Kovacevic, D Zhang, M Yao, Z Chen, Q Dong, S J Assinder & D R Richardson (2013). Dp44mT targets the AKT, TGF-beta and ERK pathways via the metastasis suppressor NDRG1 in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 108, 409–419. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.582>
- Domagk, G., Behnisch, R., Mietzsch, F., y Schmidt, H. S. (1946). Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen in vitro wirksame Verbindungsklasse. *Die Naturwissenschaften*, 33(10), 315. <https://doi.org/10.1007/BF00624524/METRICS>
- Drápela, S., Bouchal, J., Jolly, M. K., Culig, Z., y Souček, K. (2020). ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00036>
- Economopoulou, P., Kaklamani, V. G., y Siziopikou, K. (2012). The role of cancer stem cells in breast cancer initiation and progression: potential cancer stem cell-directed therapies. *The Oncologist*, 17(11), 1394–1401. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2012-0163>
- Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H., y Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24(14), 2375–2385. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208429>
- Elmore, S. (2016). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death: <http://Dx.Doi.Org/10.1080/01926230701320337>, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., y Lu, Z. (2007). Phosphorylation of β -Catenin by AKT Promotes β -Catenin Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11221–11229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611871200>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., y Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J, MacDonald S. (2002). Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol*, 50, 223–229. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0480-0>
- Finkielsztejn, L. M., Castro, E. F., Fabián, L. E., Moltrasio, G. Y., Campos, R. H., Cavallaro, L. V., y Moglioni, A. G. (2008). New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(8), 1767–1773. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.023>
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., y Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

- Fukumoto, S., Hsieh, C.-M., Maemura, K., Layne, M. D., Yet, S.-F., Lee, K.-H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W. G., Rubin, J. S., Perrella, M. A., y Lee, M.-E. (2001). Akt Participation in the Wnt Signaling Pathway through Dishevelled. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17479–17483. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000880200>
- Gao, C., y Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.021>
- Gao, D., y Li, Y. (2017). Identification and preliminary structure–activity relationships of 1-Indanone derivatives as novel indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 25(14), 3780–3791. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.017>
- Gayrard, C., Bernaudin, C., Déjardin, T., Seiler, C., y Borghi, N. (2018). Src- and confinement-dependent FAK activation causes E-cadherin relaxation and β -catenin activity. *Journal of Cell Biology*, 217(3), 1063–1077. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706013>
- Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpekis, D. V., Kyriazopoulou, V., y Zaravinos, A. (2020). EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>
- Geyer, F. C., Pareja, F., Weigelt, B., Rakha, E., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., y Reis-Filho, J. S. (2017). The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2139–2151. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.016>
- Ghafouri-Fard, S., Ahmadi Teshnizi, S., Hussen, B. M., Taheri, M., y Sharifi, G. (2023). A review on the role of NDRG1 in different cancers. *Molecular Biology Reports*, 50(7), 6251–6264. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08540-z>
- Ghosh A, Sarkar S, Banerjee S, Behbod F, Tawfik O, McGregor D, et al. (2018) MIND model for triple-negative breast cancer in syngeneic mice for quick and sequential progression analysis of lung metastasis. *PLoS ONE* 13(5): e0198143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198143>
- Gialeli, C., Theocharis, A. D., y Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal*, 278(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
- Giles, Fracasso, Kantarjian, Cortes, Brown, Verstovsek, Alvarado, Thomas, Faderl, Garcia-Manero, Wright, Samson, Cahill, Lambert, Plunkett, Sznol, DiPersio, Gandhi. (2003). Phase I and pharmacodynamic study of Triapine((R)), a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia. *Leuk Res*, 27, 1077–1083. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(03\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(03)00118-8)
- Glisoni, R. J., Chiappetta, D. A., Finkielstein, L. M., Moglioni, A. G., y Sosnik, A. (2010). Self-aggregation behaviour of novel thiosemicarbazone drug candidates with potential antiviral activity. *New Journal of Chemistry*, 34(9), 2047. <https://doi.org/10.1039/c0nj00061b>
- Godinho-Pereira, J., Lopes, M. D., Garcia, A. R., Botelho, H. M., Malhó, R., Figueira, I., y Brito, M. A. (2022). A Drug Screening Reveals Minocycline Hydrochloride as a Therapeutic Option to Prevent Breast Cancer Cells Extravasation across the Blood–Brain Barrier. *Biomedicines*, 10(8), 1988. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081988>
- Gómez, N., Santos, D., Vázquez, R., Suescun, L., Mombrú, Á., Vermeulen, M., Finkielstein, L., Shayo, C., Moglioni, A., Gambino, D., y Davio, C. (2011). Synthesis, Structural Characterization, and Pro-

- apoptotic Activity of 1-Indanone Thiosemicarbazone Platinum(II) and Palladium(II) Complexes: Potential as Antileukemic Agents. *ChemMedChem*, 6(8), 1485–1494. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100060>
- Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., y Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 593–601. <https://doi.org/10.1038/ncb1722>
- Guan, R. J., Ford, H. L., Fu, Y., Li, Y., Shaw, L. M., y Pardee, A. B. (2000). Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Research*, 60(3), 749–755.
- Guo, Z.-L., Richardson, D. R., Kalinowski, D. S., Kovacevic, Z., Tan-Un, K. C., y Chan, G. C.-F. (2016). The novel thiosemicarbazone, di-2-pyridylketone 4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone (DpC), inhibits neuroblastoma growth in vitro and in vivo via multiple mechanisms. *Journal of Hematology y Oncology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0330-x>
- Han, W., Kim, S. W., Park, I. A., Kang, D., Kim, S.-W., Youn, Y.-K., Oh, S. K., Choe, K. J., y Noh, D.-Y. (2004). Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer*, 4, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-82>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., y Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hayat, R., Manzoor, M., y Hussain, A. (2022). Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biology International*, 46(6), 863–877. <https://doi.org/10.1002/cbin.11797>
- Hedley, B. D., y Chambers, A. F. (2009). Chapter 3 Tumor Dormancy and Metastasis (pp. 67–101). [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02003-X)
- Hsu, J. M., Xia, W., Hsu, Y. H., Chan, L. C., Yu, W. H., Cha, J. H., Chen, C. Te, Liao, H. W., Kuo, C. W., Khoo, K. H., Hsu, J. L., Li, C. W., Lim, S. O., Chang, S. S., Chen, Y. C., Ren, G. X., y Hung, M. C. (2018). STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04313-6>
- Hughes, C. S., Postovit, L. M., y Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10(9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
- James, R. G., Conrad, W. H., y Moon, R. T. (2008). *β-Catenin-Independent Wnt Pathways: Signals, Core Proteins, and Effectors* (pp. 131–144). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6_10

- Jansson, M. D., y Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 590–610. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006>
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., y Costantini, F. (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1172–1183. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172-1183.2002>
- Jia, D., Lu, M., Jung, K. H., Park, J. H., Yu, L., Onuchic, J. N., Kaiparettu, B. A., y Levine, H. (2019). Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3909–3918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816391116>
- Joshi, V., Lakhani, S. R., y McCart Reed, A. E. (2022). NDRG1 in Cancer: A Suppressor, Promoter, or Both? *Cancers*, 14(23). <https://doi.org/10.3390/cancers14235739>
- Kalinowski, D. S., Quach, P., y Richardson, D. R. (2009). Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Medicinal Chemistry*, 1(6), 1143–1151. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.80>
- Kalluri, R., y Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kanso, F., Khalil, A., Nouredine, H., y El-Makhour, Y. (2021). Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: A summary of in vitro/in vivo studies. *International Immunopharmacology*, 96, 107778. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107778>
- Katt, M. E., Wong, A. D., y Searson, P. C. (2018). Dissemination from a Solid Tumor: Examining the Multiple Parallel Pathways. *Trends in Cancer*, 4(1), 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.12.002>
- Khan, Y. S., Fakoya, A. O., y Sajjad, H. (2024). *Anatomy, Thorax, Mammary Gland*.
- Knox, Hotte, Kollmannsberger, Winquist, Fisher, Eisenhauer. (2007). Phase II study of triapinea (R) in patients with metastatic renal cell carcinoma: A trial of the national cancer institute of canada clinical trials group (NCIC IND.161). *Invest New Drugs*, 25, 471–477. <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9044-9>
- Kovacevic, Z., Chikhani, S., Lovejoy, D. B., y Richardson, D. R. (2011). Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: A new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Molecular Pharmacology*, 80(4), 598–609. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073627>
- Kovacevic, Z., y Richardson, D. R. (2006). The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis*, 27(12), 2355–2366. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGL146>
- Kunos, C. A., Andrews, S. J., Moore, K. N., Chon, H. S., y Ivy, S. P. (2019). Randomized phase II trial of triapine-cisplatin-radiotherapy for locally advanced stage uterine cervix or vaginal cancers. *Front Oncol*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01067>
- Kunos CA, Colussi VC, Pink J, Radivoyevitch T, Oleinick NL. (2011). Radiosensitization of human cervical cancer cells by inhibiting ribonucleotide reductase: enhanced radiation response at low-dose rates. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80, 1198–1204. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.01.034>

- Kuran, E. D., Dincel, E. D., Biltekin, S. N., Akalın-Çiftçi, G., y Ulusoy-Güzeldemirci, N. (2023). Design, synthesis and biological evaluation of novel tetralone/indanone containing thiosemicarbazone derivatives with selective COX-2 inhibition as anticancer agents. *Journal of Molecular Structure*, 1286, 135626. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135626>
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., y Pajonk, F. (2012). Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(5), 833–844. <https://doi.org/10.1002/STEM.1058>
- Lamb, R., Ablett, M. P., Spence, K., Landberg, G., Sims, A. H., y Clarke, R. B. (2013). Wnt Pathway Activity in Breast Cancer Sub-Types and Stem-Like Cells. *PLoS ONE*, 8(7), e67811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067811>
- Le, N. T. V., y Richardson, D. R. (2004). Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood*, 104(9), 2967–2975. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1866>
- Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., y Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE*, 11(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
- Li, L., y Bhatia, R. (2011). Stem cell quiescence. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(15), 4936–4941. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1499>
- Li, L., Liu, C., Amato, R. J., Chang, J. T., Du, G., y Li, W. (2014). CDKL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Oncotarget*, 5(21), 10840–10853. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2535>
- Liu, J., Liao, S., Diop-Frimpong, B., Chen, W., Goel, S., Naxerova, K., Ancukiewicz, M., Boucher, Y., Jain, R. K., y Xu, L. (2012). TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16618–16623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117610109>
- Liu, K., Zhang, W., Dai, Z., Wang, M., Tian, T., Liu, X., Kang, H., Guan, H., Zhang, S., y Dai, Z. (2018). Cancer Management and Research Dovepress Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose-response meta-analysis. *Cancer Management and Research*, 10–143. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S144619>
- Liu, R., Li, J., Teng, Z., Zhang, Z., y Xu, Y. (2013). Overexpressed MicroRNA-182 Promotes Proliferation and Invasion in Prostate Cancer PC-3 Cells by Down-Regulating N-myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1). *PLOS ONE*, 8(7), e68982. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0068982>
- Liu, W., Xing, F., Iizumi-Gairani, M., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., Hirota, S., Kobayashi, A., Mo, Y., Fukuda, K., Li, Y., y Watabe, K. (2012). N-myc downstream regulated gene 1 modulates Wnt- β -catenin signalling and pleiotropically suppresses metastasis. *EMBO Molecular Medicine*, 4(2), 93–108. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100190>
- Liu, W., Xing, F., Iizumi-Gairani, M., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., Hirota, S., Kobayashi, A., Mo, Y. Y., Fukuda, K., Li, Y., y Watabe, K. (2012). N-myc downstream regulated

- gene 1 modulates Wnt- β -catenin signalling and pleiotropically suppresses metastasis. *EMBO Molecular Medicine*, 4(2), 93–108. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100190>
- Lovejoy, D. B., y Richardson, D. R. (2002). Novel “hybrid” iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood*, 100(2), 666–676. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.2.666>
- Lovejoy DB, Sharp DM, Seebacher N, Obeidy P, Prichard T, Stefani C, Basha MT, Sharpe PC, Jansson PJ, Kalinowski DS, Bernhardt PV, Richardson DR. (2012). Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo. *J Med Chem*, 55, 7230–7244. 10.1021/jm300768u
- Luo, X.-L., Lin, L., Hu, H., Hu, F.-L., Lin, Y., Luo, M.-L., Wang, L., y He, Y.-Q. (2020). Development and characterization of mammary intraductal (MIND) spontaneous metastasis models for triple-negative breast cancer in syngeneic mice. *Scientific Reports*, 10(1), 4681. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61679-8>
- MacFarlane, L.-A., y R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Majidpoor, J., y Mortezaee, K. (2021). Steps in metastasis: an updated review. *Medical Oncology*, 38(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>
- Mandapati, A., y Lukong, K. E. (2023). Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(7), 3701–3719. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04189-6>
- Maqbool, M., Bekele, F., y Fekadu, G. (2022). Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, Volume 14, 15–24. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S348060>
- Maria De Souza Garcia, C., Rios De Araújo, M., Teresa, M., Lopes, P., Alves, M., Ferreira, N. D., y Dantas Cassali, G. (2014). Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Braz J Vet Pathol*, 7(3), 158–165. www.bjvp.org.br
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D. C., y Radisky, E. S. (2014). Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(9), 2736–2749. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1932>
- Menezes, S. V, Fouani, L., Huang, M. L. H., Geleta, B., Maleki, S., Richardson, A., Richardson, D. R., y Kovacevic, Z. (2019). The metastasis suppressor, NDRG1, attenuates oncogenic TGF- β and NF- κ B signaling to enhance membrane E-cadherin expression in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(6), 805–818. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy178>
- Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Akcakanat, A., Chawla, A., Curran, M., Hwu, P., Sharma, P., Litton, J. K., Molldrem, J. J., y Alatrash, G. (2014). PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(4), 361–370. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0127>
- Moreno-Rodríguez, A., Salazar-Schettino, P. M., Bautista, J. L., Hernández-Luis, F., Torrens, H., Guevara-Gómez, Y., Pina-Canseco, S., Torres, M. B., Cabrera-Bravo, M., Martínez, C. M., y Pérez-

- Campos, E. (2014). In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.027>
- Mruk, D. D., y Cheng, C. Y. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting. *Spermatogenesis*, 1(2), 121–122. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16606>
- Mulrane, L., McGee, S. F., Gallagher, W. M., y O'Connor, D. P. (2013). miRNA Dysregulation in Breast Cancer. *Cancer Research*, 73(22), 6554–6562. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1841>
- Murren, Modiano, Clairmont, Lambert, Savaraj, Doyle, Sznol. (2003). Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, administered daily for five days in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 9, 4092–4100.
- Narod, S. A. (2011). Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(11), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.110>
- Narod, S. A. (2012). Breast cancer in young women. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(8), 460–470. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.102>
- National Cancer Institute. (n.d.). *What is Cancer?* [Www.Cancer.Gov/about-Cancer/Understanding/What-Is-Cancer](http://www.Cancer.Gov/about-Cancer/Understanding/What-Is-Cancer).
- Nedeljković, M., y Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 8(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 155–166. <https://doi.org/10.1038/nrm757>
- Noulsri E, Richardson DR, Lerdwana S, Fucharoen S, Yamagishi T, Kalinowski DS, Pattanapanyasat K. (2009). Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells. *Am J Hematol*, 84, 170–176. <https://doi.org/10.1002/ajh.21350>
- Nutting CM, C M L van Herpen, A B Miah, S A Bhide, J-P Machiels, J Buter, C Kelly, D de Raucourt, K J (2009). Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*, 20, 1275–1279. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn775>
- Oliveira, A. A., Oliveira, A. P. A., Franco, L. L., Ferencs, M. O., Ferreira, J. F. G., Bachi, S. M. P. S., Speziali, N. L., Farias, L. M., Magalhães, P. P., y Beraldo, H. (2018). 5-Nitroimidazole-derived Schiff bases and their copper(II) complexes exhibit potent antimicrobial activity against pathogenic anaerobic bacteria. *BioMetals*, 31(4), 571–584. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0106-6>
- Padhyé, S., y Kauffman, G. B. (1985). Transition metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. *Coordination Chemistry Reviews*, 63(C), 127–160. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(85\)80022-9](https://doi.org/10.1016/0010-8545(85)80022-9)
- Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., y Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *Npj Breast Cancer*, 2(1), 16036. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36>
- Pareja, F., y Reis-Filho, J. S. (2018). Triple-negative breast cancers — a panoply of cancer types. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(6), 347–348. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0001-7>

- Patil, S. A., Patil, R., y Patil, S. A. (2017). Recent developments in biological activities of indanones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 182–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.032>
- Perdigão-Henriques, R., Petrocca, F., Altschuler, G., Thomas, M. P., Le, M. T. N., Tan, S. M., Hide, W., y Lieberman, J. (2016). miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes. *Oncogene*, 35(2), 158–172. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.69>
- Pulaski, B. A., y Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 39(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
- Qiu, J., Xue, X., Hu, C., Xu, H., Kou, D., Li, R., y Li, M. (2016). Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 7(2), 167–173. <https://doi.org/10.7150/jca.10944>
- Rao, V. A., Klein, S. R., Agama, K. K., Toyoda, E., Adachi, N., Pommier, Y., y Shacter, E. B. (2009). The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase IIA in breast cancer cells. *Cancer Research*, 69(3), 948–957. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1437/654409/P/THE-IRON-CHELATOR-DP44MT-CAUSES-DNA-DAMAGE-AND>
- Richardson, D., Tran, E., y Ponka, P. (1995). The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood*, 86(11), 4295–4306. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.11.4295.bloodjournal86114295>
- Russell, T. D., Jindal, S., Agunbiade, S., Gao, D., Troxell, M., Borges, V. F., y Schedin, P. (2015). Myoepithelial Cell Differentiation Markers in Ductal Carcinoma in Situ Progression. *The American Journal of Pathology*, 185(11), 3076–3089. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.004>
- Salnikow, K., Kluz, T., Costa, M., Piquemal, D., Demidenko, Z. N., Xie, K., y Blagosklonny, M. V. (2002). The Regulation of Hypoxic Genes by Calcium Involves c-Jun/AP-1, Which Cooperates with Hypoxia-Inducible Factor 1 in Response to Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1734–1741. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1734-1741.2002>
- Sameti, P., Tohidast, M., Amini, M., Bahojb Mahdavi, S. Z., Najafi, S., y Mokhtarzadeh, A. (2023). The emerging role of MicroRNA-182 in tumorigenesis; a promising therapeutic target. *Cancer Cell International*, 23(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02972-0>
- Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., y Postigo, A. (2011). β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19204–19209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108977108>
- Sarmiento-Salinas, F. L., Delgado-Magallón, A., Montes-Alvarado, J. B., Ramírez-Ramírez, D., Flores-Alonso, J. C., Cortés-Hernández, P., Reyes-Leyva, J., Herrera-Camacho, I., Anaya-Ruiz, M., Pelayo, R., Millán-Pérez-Peña, L., y Maycotte, P. (2019). Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00480>
- Sarodnick, G., Heydenreich, M., Linker, T., y Kleinpeter, E. (2003). Quinoxalines. Part 12: Synthesis and structural study of 1-(thiazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]quinoxalines—the dehydrogenative

- cyclization with hydroxylamine hydrochloride. *Tetrahedron*, 59(33), 6311–6321. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01024-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01024-X)
- Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., y Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science*, 371(6536). <https://doi.org/10.1126/science.abc4552>
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., Wu, L., Lindeman, G. J., y Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84–88. <https://doi.org/10.1038/nature04372>
- Shah, M. A., Kemeny, N., Hummer, A., Drobnjak, M., Motwani, M., Cordon-Cardo, C., Gonen, M., y Schwartz, G. K. (2005). Drg1 expression in 131 colorectal liver metastases: Correlation with clinical variables and patient outcomes. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3296–3302. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2417>
- Shan, N. L., Shin, Y., Yang, G., Furmanski, P., y Suh, N. (2021). Breast cancer stem cells: A review of their characteristics and the agents that affect them. *Molecular Carcinogenesis*, 60(2), 73–100. <https://doi.org/10.1002/mc.23277>
- Sólamo, A., Soraires Santacruz, M. C., Loaiza Perez, A. I., Bal de Kier Joffé, E., Finkielstein, L. M., y Callero, M. A. (2018). N 4 -aryl substituted thiosemicarbazones derived from 1-indanones as potential anti-tumor agents for breast cancer treatment. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6), 4677–4687. <https://doi.org/10.1002/jcp.26240>
- Stanton, S. E., Adams, S., y Disis, M. L. (2016). Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes. *JAMA Oncology*, 2(10), 1354. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>
- Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), 201–218. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25>
- Steenbrugge, J., Vander Elst, N., Demeyere, K., De Wever, O., Sanders, N. N., Van Den Broeck, W., Ciamporcerio, E., Perera, T., y Meyer, E. (2021). OMO-1 reduces progression and enhances cisplatin efficacy in a 4T1-based non-c-MET addicted intraductal mouse model for triple-negative breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00234-8>
- Steenbrugge, J., Vander Elst, N., Demeyere, K., De Wever, O., Sanders, N. N., Van Den Broeck, W., Dirix, L., Van Laere, S., y Meyer, E. (2019). Comparative Profiling of Metastatic 4T1- vs. Non-metastatic Py230-Based Mammary Tumors in an Intraductal Model for Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02928>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., y Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387. <https://doi.org/10.7150/IJBS.21635>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Tajhya, R. B., Patel, R. S., y Beeton, C. (2017). Detection of matrix metalloproteinases by zymography. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1579, pp. 231–244). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6863-3_12

- Takagi, S., Simizu, S., y Osada, H. (2009). RECK Negatively Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Transcription. *Cancer Research*, 69(4), 1502–1508. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2635>
- Turek, M., Szczęśna, D., Koprowski, M., y Bałczewski, P. (2017). Synthesis of 1-indanones with a broad range of biological activity. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 451–494. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.48>
- Urooj Nazim, U. N., Silpa Narayanan, S. N., Mohsin Ali, M. A., Khalid Mohammed Khan, K. M. K., Basharat Ali, B. A., Jonathan Li, J. L., Zhe Sheng Chen, Z. S. C., y Mansoor Ahmed and Dong Hua Yang, M. A. and D. H. Y. (2021). Synthesis, Characterization and Cytotoxic Effect of Some New Thiazolyl Hydrazone Derivatives of 1-Indanone. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 43(2), 244–244. <https://doi.org/10.52568/000564>
- Usman, S., Waseem, N. H., Nguyen, T. K. N., Mohsin, S., Jamal, A., Teh, M.-T., y Waseem, A. (2021). Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers*, 13(19), 4985. <https://doi.org/10.3390/cancers13194985>
- Valenta, T., Hausmann, G., y Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Vallée, A., Lecarpentier, Y., Guillevin, R., y Vallée, J.-N. (2017). Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget*, 8(52), 90579–90604. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21234>
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H., y Moon, R. T. (2003). Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Current Biology : CB*, 13(8), 680–685. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00240-9)
- Verga Falzacappa, M. V., Ronchini, C., Reavie, L. B., y Pelicci, P. G. (2012). Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *The FEBS Journal*, 279(19), 3559–3572. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08727.x>
- Wang, Y., y Zhou, B. P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 30(9), 603–611. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10226>
- Weinstock, L. T., y Cheng, C. C. (1979). A structural modification study of procarbazine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22(5), 594–597. <https://doi.org/10.1021/JM00191A029>
- Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P., y Richardson, D. R. (2006). A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14901–14906. https://doi.org/10.1073/PNAS.0604979103/SUPPL_FILE/INDEX.HTML
- Wielenga, V. J. M., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., y Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in Apc and TcfMutant Mice Implies Regulation by the WNT Pathway. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 515–523. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65297-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65297-2)
- Won, K., y Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *International Journal of Oncology*, 57(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>
- World Health Organization. (n.d.). *Cancer*. www.who.int/Health-Topics/Cancer#tab=tab_1.

- Xu, J., Chen, Y., Huo, D., Khramtsov, A., Khramtsova, G., Zhang, C., Goss, K. H., y Olopade, O. I. (2016). β -catenin regulates *c-Myc* and *CDKN1A* expression in breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 55(5), 431–439. <https://doi.org/10.1002/mc.22292>
- Xu, J., Lamouille, S., y Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, J., Prosperi, J. R., Choudhury, N., Olopade, O. I., y Goss, K. H. (2015). β -Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 10(2), e0117097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117097>
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., y Weinberg, R. A. (2004). Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, 117(7), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Yang, L. H., Wang, S. L., Tang, L. L., Liu, B., Ye, W. Le, Wang, L. L., Wang, Z. Y., Zhou, M. T., y Chen, B. C. (2014). Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS ONE*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115293>
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., y Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., y Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, 14(1), 609. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-609>
- Yuan, J., Lovejoy, D. B., y Richardson, D. R. (2004). Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: In vitro and in vivo assessment. *Blood*, 104(5), 1450–1458. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-03-0868>
- Zeidner, J. F., Karp, J. E., Blackford, A. L., Douglas Smith, B., Gojo, I., Gore, S. D., Levis, M. J., Carraway, H. E., Greer, J. M., Percy Ivy, S., Pratz, K. W., y McDevitt, M. A. (2014). A phase II trial of sequential ribonucleotide reductase inhibition in aggressive myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 99(4), 672. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2013.097246>
- Zhan, T., Rindtorff, N., y Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- Zhang, P., Tchou-Wong, K.-M., y Costa, M. (2007). Egr-1 Mediates Hypoxia-Inducible Transcription of the *NDRG1* Gene through an Overlapping Egr-1/Sp1 Binding Site in the Promoter. *Cancer Research*, 67(19), 9125–9133. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1525>
- Zhao, X., y Richardson, D. R. (2023). The role of the *NDRG1* in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1878(3), 188871. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188871>