



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
Facultad de Química

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS  
CON CÉLULAS TUMORIGÉNICAS  
DERIVADAS DE LÍNEAS CELULARES  
DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**JACQUELINE LÓPEZ GIL**

Tutor: Dr. Alejandro García Carrancá

MÉXICO, D. F.

Marzo/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



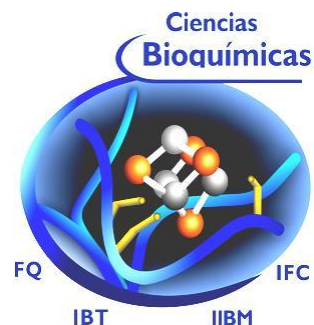
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES  
 ENRIQUECIDAS CON CÉLULAS TUMORIGÉNICAS  
 DERIVADAS DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

JACQUELINE LÓPEZ GIL

Tutor de tesis: Dr. Alejandro García Carrancá

Comité tutorial: Drs. Iván Velasco Velázquez y Alejandro Zentella Dehesa

México D.F., Marzo de 2012.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro García Carrancá.

A los Drs. Iván Velasco Velázquez, Luis Benítez Bribiesca, Alejandro Zentella, Marco Cerbón, y Patricio Gariglio.

Al Dr. Héctor Mayani y su equipo de colaboradores, Drs. Rosana Pelayo, Patricia Flores, Eugenia Flores, Antonieta Chávez y Juan Montesinos.

A los Ms. en C. Víctor Rosales, Unidad de citometría de flujo, Cinvestav, y Carlos Castellanos, Unidad de citofluorometría, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB).

A la MVZ Griselda Salmerón, Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán; MVZ Georgina Díaz, Bioterio del IIB, y MVZ Claudia Rivera, Bioterio Instituto de Fisiología Celular.

A la Dra. Adela Poitevin y al M. en C. Gabriel Resendiz, Unidad de Radioterapia, Hospital Médica Sur. Al Dr. Carlos Plascencia y a la Lic. Veverly Mendoza, Laboratorio de Oncología Genómica, Instituto Nacional de Cancerología.

A mis compañeros y amigos Salvador Vásquez, Raquel López, Pedro Chalma, Heriberto Valencia, Graciela Ruíz y Francisco Valdéz.

A mi amiga Emma Marsal Martínez, a sus padres, sobrinos, y hermanas, por acogerme en su hogar. A Alan G. Soto, por su cariño.

Por último, con particular atención, agradezco el aprecio y apoyo de mi estimada familia, en especial de mi madre Graciela Gil Zamora, mi hermana Alexandra López Gil y mi querido abuelo Luis Alberto Gil Infante.

Dedicado a mi Padre.

## **ABSTRACT**

**Background.** Cancer-initiating cells (CICs) are proposed to be responsible for the generation of metastasis and resistance to radiotherapy. Accumulating evidence indicates CICs are found among different human cancers and cell lines derived from them. Few studies address the characteristics of CICs in cervical cancer. We identify biological features of CICs from four of the best-know human cell lines derived from cervical tumors.

**Methods.** HeLa, SiHa, Ca Ski, C-4 I cell lines were cultured as spheres under stem-cell conditions. Flow cytometry was used to detect expression of CD34, CD49f and CD133 antigens and Hoechst 33342 staining to identify side population (SP). Magnetic and fluorescence-activated cell sorting was applied to enrich and purify populations used to evaluate tumorigenicity in nude mice. cDNA microarray analysis and *in vitro* radioresistance assays were carried out under standard conditions. **Results.** CICs, enriched as spheroids, were capable of generating reproducible tumor phenotypes in nu-nu mice and serial propagation. Injection of  $1 \times 10^3$  dissociated spheroid cells induced tumors in the majority of animals, whereas injection of  $1 \times 10^5$  monolayer cells remained nontumorigenic. Sphere-derived CICs expressed CD49f surface marker. Gene profiling analysis of HeLa and SiHa spheroid cells showed up-regulation of CICs markers characteristic of the female reproductive system. Importantly, epithelial to mesenchymal (EMT) transition-associated markers were found highly expressed in spheroid-derived cells. More importantly, gene

expression analysis indicated that genes required for radioresistance were also up-regulated, including components of the double-strand break (DSB) DNA repair machinery and the metabolism of reactive oxygen species (ROS). Indeed, dose-dependent radiation assays indicated that CICs-enriched populations exhibit an increased resistance to ionizing radiation (IR). **Conclusions.** We characterized a self-renewing subpopulation of CICs from four well known human cancer-derived cell lines (HeLa, SiHa, Ca Ski y C4- I) and found that they express characteristic markers of stem cells, EMT and radioresistance. The fact that CICs demonstrated a higher degree of resistance to radiation than differentiated cells suggests that specific detection and targeting of CICs could be highly valuable for the therapy of tumors from the uterine cervix.



## **RESUMEN**

**Introducción.** Las células troncales tumorales o células tumorigénicas han sido propuestas como responsables del proceso de metástasis y resistencia a radioterapia. Evidencia acumulada en los últimos años indica que las células tumorigénicas se localizan en diferentes tumores humanos y líneas celulares derivadas de ellos. A la fecha, pocos estudios se han hecho para caracterizar las células tumorigénicas de cáncer cérvico uterino. En este estudio, identificamos características biológicas de poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas provenientes de líneas celulares humanas derivadas de tumores cérvico uterinos. **Métodos.** Las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y C4- I fueron cultivadas en medios específicos para células troncales/progenitoras. Los agregados celulares no adherentes generados fueron analizados para la detección de los antígenos de superficie CD34, CD133 y CD49f y la exclusión del colorante Hoechst 33342 por citometría de flujo. Las poblaciones celulares fueron separadas por MACS y FACS a fin de evaluar su capacidad tumorigénica en ratones inmunodeficientes. En adición, se realizó un análisis de expresión génica a través de un microarreglo de cADN y un ensayo funcional de radioresistencia *in vitro*. **Resultados.** Las células tumorigénicas, enriquecidas como esferas, generaron tumores en serie en ratones nu-nu con fenotipos reproducibles. La inyección de  $1 \times 10^3$  células derivadas de esferas generó tumores, mientras que la inyección de  $1 \times 10^5$  células cultivadas en monocapa se mantuvieron no tumorigénicas. Las

células derivadas de esferas expresaron el antígeno de superficie CD49f. El análisis de expresión génica de las poblaciones celulares enriquecidas mostró sobre-expresión de marcadores característicos de células troncales presentes en órganos del sistema reproductivo femenino. Igualmente, genes asociados a la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y genes relacionados con radioresistencia también fueron sobre-expresados, incluyendo componentes de la maquinaria de reparación de ADN y genes involucrados en el metabolismo de especies reactivas del oxígeno (ERO). Los ensayos de radiación, dosis dependientes, indicaron que las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas presentan mayor resistencia a las radiaciones ionizantes (RI). **Conclusiones.** Caracterizamos una población enriquecida en células tumorigénicas derivada de líneas celulares provenientes de tumores cérvico uterinos. Esta población, con capacidad de autorenovar, recapituló el fenotipo tumoral y expresó marcadores característicos de células troncales y de la transición epitelio-mesenquimal. Adicionalmente, la población aislada presentó mayor resistencia a la radiación ionizante, sugiriendo que su detección específica y eliminación podría ser valiosa en el tratamiento de tumores cérvico uterinos.

## ***ÍNDICE***

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Células tumorigénicas</b>	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>Células tumorigénicas en cáncer cérvico uterino</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>BILIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrategias comúnmente empleadas en la identificación y aislamiento de células tumorigénicas.	15
<b>Figura 2.</b>	Cultivo de agregados celulares no adherentes derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino, y medida de su capacidad de autorenovación <i>in vitro</i> .	35
<b>Figura 3.</b>	Eficiencia de formación de colonias en agar blando de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	36
<b>Figura 4.</b>	Inmunfenotipo de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	38
<b>Figura 5.</b>	Identificación de la población marginal o <i>Side population</i> en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.	40
<b>Figura 6.</b>	Pesos de tumores derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	43
<b>Figura 7.</b>	Inmunohistoquímica de tumores derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	44
<b>Figura 8.</b>	Expresión diferencial de genes asociados a células troncales y a la transición epitelio-mesenquimal en líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones no adherentes.	47
<b>Figura 9.</b>	Respuesta a la radiación ionizante de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	49

## ***LISTA DE TABLAS***

<b>Tabla 1.</b>	Marcadores asociados a células tumorigénicas de útero y ovario.	17
<b>Tabla 2.</b>	Marcadores asociados a células troncales o tumorigénicas de cuello uterino.	25
<b>Tabla 3.</b>	Tumorigenicidad de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	44
<b>Tabla 4.</b>	Parámetros de respuesta a la radiación ionizante de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes.	50

## ***LISTA DE ANEXOS***

- Anexo 1.** Grupos de genes seleccionados cuya expresión diferencial es superior a 1,5 o inferior a - 1,5 cambios de intensidad en células HeLa cultivadas en condiciones no adherentes. 63
- Anexo 2.** Grupos de genes seleccionados cuya expresión diferencial es superior a 1,5 o inferior a - 1,5 cambios de intensidad en células SiHa cultivadas en condiciones no adherentes. 66
- Anexo 3.** Artículo: López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. BMC Cancer 2012, 12:48. 69

### **1.1 Células tumorigénicas**

A partir de observaciones morfológicas realizadas por Rudolf Virchow y Julius Cohnheim, a finales del siglo XIX, es reconocido que los tumores exhiben marcada heterogeneidad celular. En un tumor existen poblaciones celulares con características fenotípicas variadas manifestadas, entre otras, por su morfología, expresión de antígenos de superficie y proteínas de diferenciación. De la misma manera, las poblaciones celulares que hacen parte de un tumor exhiben características funcionales reflejadas en diferentes grados de proliferación, observado *in vitro* a través de ensayos de formación de colonias; diferentes grados de tumorigenicidad, observado *in vivo* por medio de xeno trasplantes; diferente capacidad metastásica y de respuesta a tratamiento, entre algunas características.

La heterogeneidad celular tumoral se ha intentado explicar a partir de modelos de carcinogénesis. El modelo estocástico postula que la heterogeneidad celular deriva de poblaciones celulares con características biológicas equivalentes, producto de la selección y expansión de clones con ventajas de crecimiento. Es así como, cualquier célula tiene la capacidad de formar nuevos tumores.[1] Por su parte, el modelo jerárquico establece que la heterogeneidad celular deriva de poblaciones celulares con diferentes características fenotípicas y funcionales en donde una población, minoritaria en la mayoría de casos,

tiene la capacidad de formar nuevos tumores.[2] A esta población se le ha denominado células tumorigénicas, iniciadoras de cáncer o troncales tumorales. En el año 2006, la Asociación Americana de Investigación en Cáncer definió una célula troncal tumoral como una célula tumoral que posee la capacidad de autorenovar y generar los diferentes linajes celulares que componen un tumor.[3] Estas células son definidas experimentalmente por su habilidad de recapitular de manera continua un tumor en modelos animales. Desde mediados de los años 90s, se ha generado amplia evidencia experimental que apoya la validez de este último modelo en diferentes tipos de cáncer.

La identificación y aislamiento de células tumorigénicas inicia en 1994 con el estudio de Lapidot y cols.[4] Los autores identificaron células iniciadoras de leucemia mieloide aguda a través de trasplantes en ratones SCID (por sus siglas en inglés de *severe combined immune-deficient*). Estas células tienen la capacidad de migrar a médula ósea y proliferar ampliamente en respuesta a citocinas generando un patrón de diseminación y morfología celular leucémica semejante al encontrado en pacientes. Lapidot y cols. separaron células leucémicas con base en la expresión de marcadores de superficie y encontraron que las células iniciadoras de leucemia con capacidad de injertar en ratones SCID y producir un mayor número de progenitores fueron  $CD34^+CD38^-$ , mientras que las poblaciones celulares  $CD34^+CD38^+$  y  $CD34^-$  no contuvieron células con estas características.

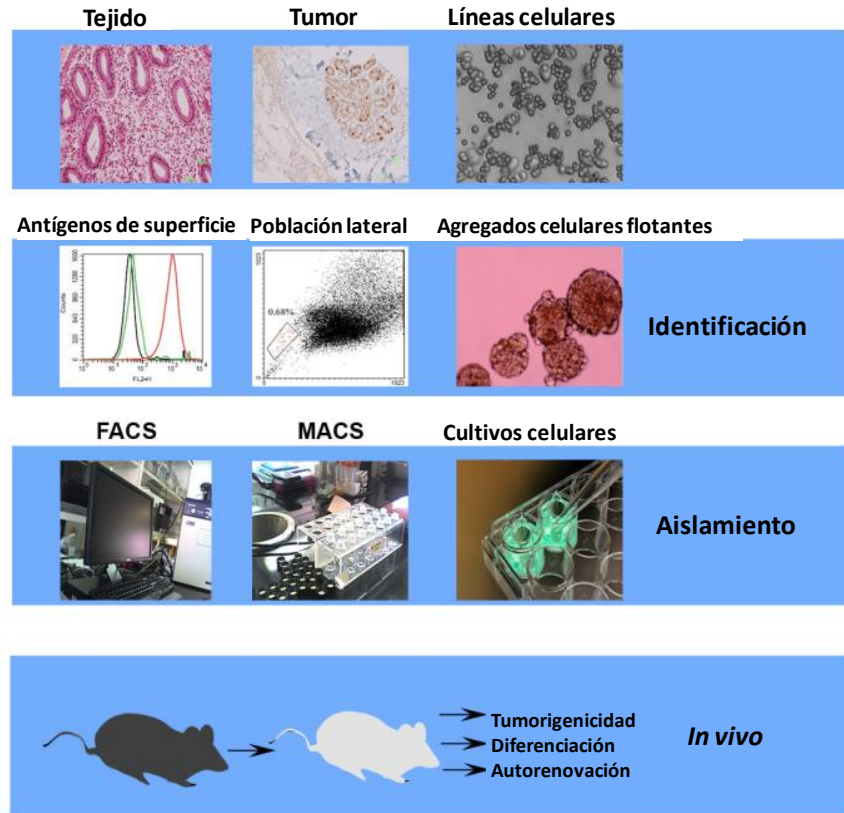
Este estudio presentó limitantes técnicas relacionadas con el número y pureza de las poblaciones celulares separadas y la incapacidad de generar tumores secundarios. El mismo grupo, liderado por el Dr. J. Dick en un estudio encabezado por Bonnet y cols.[5], empleó posteriormente ratones más inmunodeficientes, NOD/SCID (por sus siglas en



inglés de *non obese diabetic/severe combined immune-deficient*), y poblaciones celulares de mayor pureza, logrando corroborar que la población  $CD34^+CD38^-$ , proveniente de pacientes con leucemia mieloide aguda, tiene la capacidad de autorenovar y diferenciar *in vivo*.

En el año 2003, Al-Hajj y cols., bajo la dirección del Dr. M. Clarke, identificaron y aislaron células tumorigénicas en ocho muestras de cáncer de mama, caracterizadas por la expresión de los marcadores  $CD44^+CD24^-Lin^-$ . [6] Cien células con este inmunofenotipo generaron tumores en ratones NOD/SCID, en tanto que miles con el inmunofenotipo alternativo,  $CD44^+CD24^+$ , fallaron. Esta población pudo ser trasplantada de manera seriada, y en cada trasplante la población generó tumores compuestos por células tumorigénicas y no tumorigénicas que recapitulaban la diversidad fenotípica del tumor inicial. Posterior a este trabajo diferentes poblaciones de células tumorigénicas han sido identificadas en tumores sólidos tales como cerebro [7], próstata [8], colon [9-11], cuello y cabeza [12], páncreas [13, 14], hígado [15], y melanoma [16].

Adicional al empleo de antígenos de superficie para el aislamiento de células tumorigénicas, otras estrategias metodológicas han sido ampliamente empleadas (Fig. 1). Una de ellas es conocida como *Side population (SP)*, o población marginal. Goodell y cols., al experimentar con el colorante Hoeschst 33342 en células murinas de médula ósea y medir la fluorescencia del colorante a dos longitudes de onda simultáneamente, observaron una población marginal pequeña y distintiva enriquecida con marcadores de células troncales hematopoyéticas. [17]



**Figura 1** – Estrategias comúnmente empleadas en la identificación y aislamiento de células tumorigénicas. Abreviaturas: FACS, fluorescence-activated cell sorting; MACS, Magnetic-activated cell sorting.

Otro enfoque alternativo es el de formación de agregados celulares no adherentes o esferas. En 1992, Reynolds y cols. aislaron células del cuerpo estriado de ratón adulto inducidas a proliferar *in vitro* con factor de crecimiento epidermal (o EGF, por sus siglas en inglés).[18] Estas células, cultivadas como esferas no adherentes, expresaron Nestina, un filamento intermediario encontrado en células troncales neuroepiteliales. Bajo condiciones de diferenciación, estas células desarrollaron la morfología y propiedades

antigénicas de neuronas y astrocitos. Las células con morfología neural fueron inmunoreactivas para Ácido alfa Aminobutírico y Sustancia P, dos neurotransmisores del cuerpo estriado adulto. Las células aisladas de esta manera proliferaron y diferenciaron *in vitro*. A la fecha, varios modelos tumorales han sido evaluados por su capacidad de generar esferas enriquecidas en células tumorigénicas, algunos de ellos son mama [19, 20], piel [21], ovario [22], y próstata.[23]

Al igual que en otros tejidos, las células troncales juegan un papel fundamental en la fisiología del sistema reproductivo femenino y están involucradas en la respuesta a lesiones. Recientemente, varios estudios han proporcionado evidencia de la existencia de células tumorigénicas en tejido endometrial y ovárico humano. Antígenos de superficie, tales como CD44, CD117, CD133 y MYD88, se han empleado para aislar células tumorigénicas en ovario. Igualmente, células epiteliales y estromales con capacidad de formar colonias en agar blando, células SP y células LRC (por sus siglas en inglés de *label retaining cells*) con características propias de células troncales han sido descritas en tejidos tumorales de endometrio (Tabla 1).

## **1.2 Células tumorigénicas en cáncer cérvico uterino**

A escala mundial, el cáncer cérvico uterino ocupa el segundo lugar entre las neoplasias malignas más frecuentes en mujeres con cerca de 530.000 nuevos casos por año y más 274.000 muertes.[24] En la actualidad, aproximadamente el 35% de las mujeres diagnosticadas presentan recidiva de la enfermedad, siendo el 90% de estos casos

desarrollados en menos de 3 años posterior al tratamiento inicial.[25] Por lo tanto, el desarrollo de terapias dirigidas y estrategias de radio y quimio sensibilización son necesarios a fin de reducir las tasas de mortalidad.

**Tabla 1** – Marcadores asociados a células tumorigénicas de útero y ovario.

<b>Cáncer de útero</b>	Células formadoras de colonias	Hubbard, 2009 [26]
	SP <sup>+</sup>	Friel, 2008 [27] Kato, 2010 [28]
	CD133 CD44	Rutella, 2009 [29] Afify, 2005 y 2006 [30, 31]
<b>Cáncer de ovario</b>	Células formadoras de colonias	Bapat, 2005 [32]
	SP <sup>+</sup>	Szoket, 2006 [33]
	CD44 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup>	Zhang, 2008 [22]
	CD133 <sup>+</sup>	Curley, 2009 [34] Baba, 2009 [35] Ferrandina, 2008 [36] Kusumbe, 2009 [37]
	CD44 <sup>+</sup> , MYD88 <sup>+</sup>	Alvero, 2009[38]

A partir de estudios morfológicos, es conocido que las células de reserva, ubicadas en las capas basales del epitelio escamoso poliestratificado, son menos diferenciadas y tienen capacidad de experimentar diferenciación escamosa.[39] Previamente, p63 ha sido descrito como marcador de células escamosas basales y células columnares de reserva en epitelio cérvico uterino.[40, 41] Martens y cols. identificaron una población de potenciales

células troncales empleando anticuerpos para p63 y CK17 en tejido normal endo- y exocervical y en neoplasias intraepiteliales cérvico uterinas (NIC) I, II y III. En todos los casos, las células de reserva presentaron fuerte tinción para p63 (nuclear) y CK17 (citoplasmática), principalmente en las capas basales del epitelio exocervical y de las neoplasias, independiente del grado.[42]

Posteriormente, Martens y cols. examinaron la expresión de p63, Bcl-2 y las citoqueratinas 5, 7, 8 y 17 a lo largo del canal endocervical adulto empleando cortes sagitales de cuello uterino normal.[43] Observaron que las células de reserva estaban presentes a lo largo de todo el canal y en todos los cortes examinados sin embargo, se observó una mayor concentración de células de reserva cerca a la unión escamoso-columnar y en el tercio superior del cuello uterino. El patrón de expresión en las células de reserva fue el mismo a lo largo de los cortes excepto por CK17, citoqueratina que presentó un gradiente decreciente de expresión desde la parte distal a la proximal.[43] En conclusión, observaron un patrón de distribución discontinua de células de reserva a lo largo del canal cérvico uterino y dos poblaciones celulares: una CK17<sup>+</sup> en la parte inferior del canal, progenitora de epitelio escamoso y columnar, y otra CK17<sup>-</sup> responsable de la generación exclusiva de células columnares.

Las proteínas Nanog, nucleostemin (NS) y Musashi1 (Msi1), expresadas en células troncales embrionarias, están asociadas con la regulación de la diferenciación, proliferación y división asimétrica de células troncales, respectivamente. Ye y cols. examinaron la expresión de estas proteínas en lesiones y carcinomas epiteliales cérvico uterinos y evaluaron su asociación con variables de pronóstico.[44] Observaron

asociación entre los niveles de expresión de Nanog, NS y Msi1 y los cambios epiteliales, siendo significativamente mayores los niveles de expresión proteica en carcinomas de células escamosas comparado con lesiones intraepiteliales y, a su vez, con tejido epitelial normal. Sin embargo, a pesar de no haberse observado correlación positiva entre los niveles de expresión de las tres proteínas y los factores clínico-patológicos de pronósticos analizados, estos resultados indican que Nanog, NS y Msi1 podrían estar implicadas en la carcinogénesis cérvico uterina y su progresión.

Liu y cols. investigaron la expresión de otras proteínas asociadas a células troncales y su relación con el VPH tipo 16.[45] Para tal fin, evaluaron la expresión de PSCA, PIWIL1, TBX2 y E7 de VPH 16 en 59 muestras de carcinomas escamosos y sus correspondientes tejidos normales adyacentes. Los porcentajes de expresión de PSCA, PIWIL1 y TBX2 en tejido normal fueron 6% (3/52), 8% (4/52) y 2% (1/52), respectivamente, y en carcinomas 62% (32/52), 75% (39/52) y 52% (27/52), respectivamente. Sin embargo, no se presentó correlación entre el aumento de expresión de PSCA, PIWIL1 y TBX2 y el grado histológico. La expresión de PSCA y PIWIL1 se asoció positivamente con invasión tumoral y TBX2 con metástasis en ganglios linfáticos. VPH 16 mostró correlación positiva con PSCA, PIWIL1 y TBX2 en carcinomas, sugiriendo que la oncoproteína viral E7 podría estar implicada en la regulación de la expresión de genes asociados a células troncales. Recientemente, Ye y cols. identificaron la expresión de PIWIL2-like (PL2L), predominantemente en cáncer cérvico uterino primario y metastásico en asociación con el factor NF- $\kappa$ B.[46] Investigaciones adicionales son requeridas para demostrar el papel del VPH 16 en la modulación de la expresión de estas proteínas.

Sox2 es un miembro de la familia que codifica los factores de transcripción SOX, expresados en diversas fases del desarrollo embrionario, afectando el destino y la diferenciación celular. Ji y cols. examinaron la expresión de Sox2 en tejidos cérvico uterinos normales y tumorales.[47] También compararon la expresión de Sox2 en agregados celulares no adherentes o tumoresferas y sus correspondientes células diferenciadas. Por último, estudiaron la expresión estable de Sox2 en SiHa y HeLa y su papel en la proliferación celular y carcinogénesis. Los resultados del estudio sugieren que el gen Sox2 podría contribuir en la tumorigénesis cérvico uterina por las siguientes observaciones: (1) 80% de las NIC III o carcinomas cérvico uterinos y 25% de las muestras de tejido normal expresaron la proteína Sox2, (2) carcinomas escamosos grados II y III presentaron una intensidad relativamente mayor comparado con carcinomas escamosos grado I, y (3) Sox2 fue expresado significativamente en las tumoresferas derivadas de carcinomas primarios y rara vez detectada en células diferenciadas. También se evidenció que la expresión exógena de Sox2 promovió tanto la proliferación como la capacidad de formar colonias en agar. Así mismo, la expresión exógena mejoró la capacidad tumorigénica de las células derivadas de esferas. Otro marcador asociado con el mantenimiento de la pluripotencia de células troncales embrionarias es el factor de transcripción Oct4. No obstante, la expresión de esta proteína no ha sido identificada en HeLa empleando técnicas como inmunofluorescencia, PCR y Western blot. Cantz y cols. encontraron que la región promotora Oct4 se encuentra altamente metilada en HeLa y por tanto, argumentan que resultados relacionados con la expresión de Oct4 en líneas

celulares tumorales podrían atribuirse a la expresión del pseudogen o a interpretaciones erróneas de señales de fondo.[48]

Otro marcador útil en la identificación de células tumorigénicas es la enzima ALDH1 (por sus siglas en inglés de *Aldehyde dehydrogenase 1*), responsable de la oxidación del retinol a ácido retinoico. La expresión de ALDH1 en carcinomas cérvico uterinos fue evaluada por Yao y cols. mediante inmunohistoquímica.[49] 23 de 89 muestras de carcinoma escamoso invasivo y 4 de 20 muestras de adenocarcinomas presentaron inmunorreactividad a ALDH1. En total, se observó la expresión de ALDH1 en el 24,7% de las muestras. Análisis por citometría de flujo, PCR y Western blot confirmaron la presencia de pequeñas poblaciones celulares ALDH1 positivas. Adicionalmente, se estudió la expresión del antígeno CD133, marcador de células troncales, encontrando bajos niveles de expresión en muestras de carcinomas cérvico uterinos.

Bortolomai y cols. compararon las líneas celulares Ca Ski, SiHa y A431 por su eficiencia para generar agregados celulares no adherentes y la actividad enzimática ALDH1.[50] La línea celular A431 presentó la mayor fracción ALDH1 positiva y la mejor correlación entre la actividad ALDH1 y la generación de tumoresferas por tanto, A431 fue seleccionada como modelo experimental para la caracterización de poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas. Sin embargo, la línea celular A431 fue establecida a partir de un carcinoma epidermoide de vulva.[51]

A la fecha, varios estudios indican que la transición epitelio-mesenquimal (TEM) puede dotar a las células de características propias de células troncales.[52-54] Li y cols.



indujeron el proceso de TEM en las líneas celulares MCF7 y HeLa a través de la sobre-expresión de Twist, factor de transcripción clave en la TEM.[55] En células que sobre-expresaron Twist, la eficiencia de formación de esferas y la expresión de CD44 y ALDH1 fueron mayores. De igual manera, se observó la activación de las vías de Akt y  $\beta$ -catenina siendo la última correlacionada con la expresión de CD44; aún más, la inhibición de  $\beta$ -catenina y de la vía Akt suprime en gran medida la expresión de CD44. Estos resultados sugieren a  $\beta$ -catenina y moléculas involucradas en la vía Akt como potenciales blancos para suprimir características propias de las células tumorigénicas.

En 2009, Feng y cols. generaron agregados celulares no adherentes en medio selectivo para el crecimiento de células troncales/progenitoras a partir de carcinomas primarios cérvico uterinos.[56] Ocho de diecinueve cultivos en generaron esferas con extensiva capacidad proliferativa. Los agregados esferoidales fueron positivos para los marcadores CD44, CK17 y negativos para CD34 y CD105. Los ensayos de quimioresistencia indicaron que las esferas fueron más resistentes a doxorubicina. Los ensayos de tumorigenicidad revelaron que  $1 \times 10^5$  células derivadas de esferas generaron tumores en ratones inmunodeficientes y que estos tumores recapitulaban en su totalidad la histología del tumor original, mientras que la misma cantidad de células tumorales cultivadas en condiciones adherentes se mantuvo no tumorigénica. Por último, ensayos de PCR y Western blot evidenciaron la expresión de genes característicos de células embrionarias y somáticas en los agregados celulares cérvico uterinos, tales como Piwil2, c-Myc, STAT3 y Sox2.

Empleando la misma estrategia de enriquecimiento, Gu y cols. aislaron células formadoras de esferas a partir de HeLa y SiHa.[57] Células HeLa derivadas de esferas presentaron mayor tumorigenicidad respecto a las células cultivadas en monocapa, demostrado a partir del trasplante de  $1 \times 10^4$  celulares en ratones inmunodeficientes, en comparación con  $1 \times 10^6$  células HeLa cultivadas en monocapa. En adición, esta población presentó mayor expresión del oncogen E6 del VPH (6,9 veces) y el silenciamiento del gen E6 en la población de estudio inhibió la formación de esferas. Así mismo, la expresión de las tres isoformas del factor de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) fue significativamente disminuida mientras que, el nivel de expresión del factor inhibidor de leucemia se mantuvo sin cambios. Este resultado sugiere que el silenciamiento de E6 tiene un efecto específico sobre la expresión de algunos genes de autorenovación. Con el fin de confirmar la desregulación de TGF- $\beta$ , producto del silenciamiento de E6, fue evaluada la expresión de dos componentes de la vía, H-Ras y K-Ras. La expresión del gen Ras disminuyó notablemente, sugiriendo que el efecto inhibidor del crecimiento podría atribuirse a la vía TGF- $\beta$ . Gu y cols. consideran que la regulación negativa de la vía PI3K/Akt después del silenciamiento de E6 es el vínculo que, indirectamente, afecta la expresión de TGF- $\beta$  no obstante, esto requiere futuras demostraciones.

Por último, algunos marcadores poco explorados en cáncer cérvico uterino, y empleados en este estudio, son CD49f, CD34 y CD133. El antígeno de superficie celular CD49f corresponde a la subunidad alfa 6 de integrinas. Las integrinas son receptores de membrana relacionadas con procesos de adhesión (célula-matriz extracelular), señalización, proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular. La integrina alfa 6

se localiza principalmente en la superficie celular de las capas basales de epitelios estratificados, como componente estructural de los hemidesmosomas. La subunidad alfa 6 heterodimeriza con la subunidad beta 1 (CD29) o con la subunidad beta 4, receptor para laminina, componente de matriz extracelular. El antígeno CD49f ha sido identificado como marcador de células troncales de mama, próstata y epidermis interfolicular.[58, 59] Igualmente, CD49f es marcador de agregados celulares no adherentes enriquecidos con células tumorigénicas de mama [20, 60, 61] y próstata.[23] En el caso de los agregados celulares no adherentes generados a partir de la línea celular MCF7, y enriquecidos con CD49f, se observó disminución de la capacidad tumorigénica y de formación de agregados celulares, posterior al bloqueo con ARN de interferencia de la integrina alfa 6, demostrando que la subunidad alfa 6 es necesaria para la tumorigenicidad y proliferación celular en condiciones independientes de anclaje.[60] El antígeno CD34 es una proteína transmembranal de superficie celular, perteneciente a la familia de las sialomucinas. CD34 es marcador de células troncales de folículo piloso, endoteliales y hematopoyéticas.[4, 5] Dentro de las funciones asociadas a esta proteína están la promoción de la proliferación celular, bloqueo de la diferenciación, adhesión celular y migración de células troncales hematopoyéticas.[62] El sistema hematopoyético y urogenital comparten origen embrionario, razón por la es posible encontrar marcadores compartidos entre estos sistemas. CD133 es una glicoproteína transmembranal, marcador de células troncales hematopoyéticas y células tumorigénicas de colon, próstata, pulmón, ovario, páncreas, melanomas y glioblastomas.[63] CD133 ha sido identificado como marcador de agregados celulares no adherentes enriquecidos con células tumorigénicas de mama, junto a

CD49f.[61] Pese a su utilidad como marcador de células tumorigénicas, su función biológica es desconocida en la actualidad.

**Tabla 2 – Marcadores asociados a células troncales o tumorigénicas de cuello uterino.**

Muestra	Marcador	Porcentaje de células tumorigénicas	Mínimo número de células que generan tumor	Recapitulación del fenotipo tumoral	Trasplantes seriados	Análisis/ensayos adicionales	Referencias
Tejido normal y NIC-I, -II y -III	p63 CK17	-	-	-	-	-	Martens, 2004[42]
Tejido normal y CE	Nanog Musashi-1 Nucleosteomina	Tejido normal < 65% CE > 90%	-	-	-	Correlación con características clínico-patológicas	Ye, 2008[44]
Tejido normal y CE	PSCA PIWIL1 TBX2	Tejido normal < 9% CE > 50%	-	-	-	Correlación con características clínico-patológicas y VPH16	Liu, 2010[64]
Tejido normal, NIC-III y CE	Sox2	Tejido normal: 25% NIC-III: 83% CE: 77%	10 <sup>6</sup> células SiHa-Sox2	Si	No	Proliferación celular y formación de colonias en agar blando de células SiHa- y HeLa-Sox2	Ji, 2010[47]
CE invasivo y adenocarcinoma	ALDH	CE invasivo 25% Adenocarcinoma 20%	-	-	-	Expresión de CD133	Yao, 2011[49]
SiHa y Ca Ski	ACNA ALDH	Ca Ski: 32% SiHa: 0%	-	-	-	Caracterización de agregados celulares no adherentes derivados de la línea celular A431	Bortolomai, 2010[50]
HeLa	ACNA ALDH1 CD44	-	-	-	-	Efecto de la expresión de Twist sobre la formación de ACNA y la expresión de ALDH1 y CD44.	Li, 2011[55]
CE	ACNA	-	10 <sup>5</sup>	Yes	No	Ensayo de quimiorresistencia. Expresión de genes de células troncales embrionarias.	Feng, 2009[56]
HeLa, SiHa, Ca Ski y C33A	ACNA	HeLa: 18%	10 <sup>4</sup> HeLa	-	No	Ensayo de quimiorresistencia y bloqueo de E6 en células HeLa derivadas de ACNA	Gu, 2011[57]

Abreviaturas: NIC, neoplasia intrepitelial cérvico uterina; CE, carcinoma escamoso; VPH, virus del papiloma humano; ACNA, agregados celulares no adherentes; ALDH1, aldehído deshidrogenasa 1.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO**

A partir de mediados de los años 90s, las células tumorigénicas, con características propias de células troncales, han sido propuestas como responsables del proceso de carcinogénesis. Recientemente, se ha intentado aislar células tumorigénicas del sistema reproductivo femenino empleando antígenos de superficie, tinción de Hoescht, formación de esferas y marcadores de células troncales. Sin embargo, pocos estudios evalúan la capacidad de formación de tumores *in vivo* o presentan una caracterización más completa que permita un mejor entendimiento de su biología. El aislamiento y caracterización de células tumorigénicas, etapas iniciales en la búsqueda de los mecanismos moleculares involucrados en la génesis, promoción y progresión de tumores, podría permitir el desarrollo de terapias curativas específicas. Para tal fin, el empleo de líneas celulares previamente establecidas, fuente alternativa para el estudio de esta población, cobra importancia como herramienta experimental. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas derivadas de cuatro líneas celulares de cáncer cérvico uterino, HeLa, SiHa, Ca Ski, y C-4 I.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cultivo celular.** Las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski, y C-4 I se mantuvieron en medio modificado Dubelcco de Eagle (DMEM, Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco) y 100 mg/ml de estreptomina (Gibco). Las células se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, y 95% de aire ambiente. Todos los experimentos se realizaron con cultivos al 70 – 80% de confluencia.

**Cultivo de agregados celulares no adherentes.** Las células se cultivaron en medio libre de suero con 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Invitrogen), 20 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, Invitrogen), y 0,4% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a una concentración de  $1 \times 10^3$  células/ml en placas de adherencia ultra-baja (Costar). Los medios de cultivo se cambiaron cada 48 horas durante 7 días. Las esferas recolectadas se centrifugaron a 2.500 rpm por 5 min y disociaron con solución de EDTA 1.0 mM. La suspensión se tamizó en malla celular de nylon de 40  $\mu$ m. Finalmente,  $1 \times 10^3$  células/ml fueron nuevamente sembradas en medio fresco para la generación de esferas secundarias.

**Ensayo de eficiencia de formación de esferas.** Las esferas fueron disociadas con solución de EDTA 1.0 mM y tamizadas en malla celular de nylon de 40  $\mu$ m, visualmente se verificó la ausencia de conglomerados celulares. Cien células por pozo se sembraron en placas de

96 pozos con 200  $\mu$ l de medio. Cada dos días se adicionaron 25  $\mu$ l de medio nuevo por pozo. El conteo de esferas en cada pozo se realizó 7 días después de la siembra. La eficiencia de formación de esferas se calculó como el número de esferas formadas, dividido por el número inicial de células sembradas y expresado como porcentaje.[19] El cálculo se realizó desde la primera hasta la quinta generación en las cuatro líneas celulares.

**Ensayo de diferenciación.** Las esferas fueron disociadas con solución de EDTA 1.0 mM y sembradas en láminas cubiertas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y DMEM suplementado con SFB, sin factores de crecimiento. Las células fueron procesadas 7 días después por inmunocitoquímica con el anticuerpo humano anti-citoqueratina AE1/3 (1:50 dilución final, Dako). La visualización de la señal se realizó con el sistema LSAB + System-HRP (Dako). Las células fueron contrateñidas con hematoxilina.

**Ensayo de formación de colonias en agar blando.** Pozos de 35 mm en placas de seis fueron cubiertos con 2 ml de DMEM, 10% de SFB y 0,6% de agar. Después de solidificar, 2 ml de suspensión celular con DMEM, 10% de SFB y 0,3% de agar Noble (BD Difco) fueron añadidos en cada pozo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 21 días. Las colonias se fijaron con glutaraldehído 6,0% y se tiñeron con cristal violeta al 0,5%. El conteo de colonias se realizó en microscopio de disección y se calculó la eficiencia de formación de colonias.

**Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo.** Un millón de células fueron incubadas durante 10 min a 4°C con el reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi Biotech), seguido

del marcaje con los anticuerpos monoclonales anti-CD34 (AC136, 1:11 dilución, Miltenyi Biotec), -CD49f (GoH3, 01:11 dilución, Becton Dickinson) y -CD133 (AC133/1, 1:11 dilución, Miltenyi Biotec). Después de 15 min a 4°C, las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS frío y resuspendidas en 0,5 mg/ml de Yoduro de Propidio durante 10 min a temperatura ambiente. En el análisis por citometría de flujo se empleó el equipo FACS Calibur (BD Biosciences, CA, EE.UU.) y el programa Cell Quest Pro (BD Biosciences, CA, EE.UU.). La fluorescencia de fondo se estableció empleando anticuerpos de isotipo conjugados a fluorocromos de la misma casa comercial. Poblaciones celulares enriquecidas con células troncales hematopoyéticas provenientes de sangre de cordón umbilical se emplearon como controles positivos para CD133 y CD34, y leucocitos de sangre periférica humana para CD49f.

**Caracterización de la población marginal o *Side population*.** Un millón de células se suspendieron en 1,0 ml de DMEM con 2% de SFB, 1 mM Hapes, y 5 mg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) pre-calentado a 37°C y se incubaron con agitación constante y lenta durante 90 min a 37°C. Cuando se empleó Verapamilo como control, las células fueron teñidas como se describe en presencia de 50 µM de Verapamilo (Sigma-Aldrich).[17] Después de la tinción, las células se lavaron con solución salina tamponada de Hank. Justo antes del análisis, se adicionó Yoduro de Propidio a una concentración final de 2 mg/ml. Como control positivo se emplearon poblaciones celulares enriquecidas con células troncales hematopoyéticas extraídas de médula ósea de fémures y tibias de ratones nu-nu. El análisis y separación celular se realizaron en el equipo MoFlo (Beckman Coulter, CA,



EE.UU.) equipado con una multilínea laser I-90 ultravioleta de 60 mW. La coloración azul de Hoechst 33342 se detectó a 424/24 nm y la roja a 590/30 nm.

**Enriquecimiento y separación de poblaciones celulares por MACS y FACS.** Un millón de células se marcaron con 1  $\mu$ l de los anticuerpos unidos a microperlas magnéticas anti-CD133 (CD133/1, Miltenyi Biotec) y 1  $\mu$ l de -CD34 (QBEND/10, Miltenyi Biotec), empleando los correspondientes kits de aislamiento de Miltenyi Biotec. El enriquecimiento celular para CD49f se realizó con el anticuerpo anti-CD49f-PE (GoH3, Becton Dickinson) y el anticuerpo unido a microperlas magnéticas anti-PE (PE4-14D10, MiltenyiBiotec). La separación de las poblaciones celulares enriquecidas con los antígenos descritos y de la población SP se realizó en el equipo MoFlo (Beckman Coulter, CA, EE.UU.). Por lo menos 5.000 eventos se adquirieron por cada muestra, excluyendo las células positivas para Yoduro de Propidio, a fin de evaluar la pureza de las poblaciones celulares positivas y negativas con los anticuerpos anti-CD133/2-PE (239C3, Miltenyi Biotec), anti-CD49f (450-30A, Serotec), y anti-CD34-PE (AC136, Miltenyi Biotec). Los porcentajes de pureza variaron entre el 83 - 94% y el 89 - 99,7% para las poblaciones celulares positivas y negativas, respectivamente.

**Ensayos de tumorigenicidad.** Los experimentos con animales siguieron los lineamientos contemplados en la Ley Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo de experimentación recibió aprobación del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las células, obtenidas bajo condiciones adherentes y no adherentes, se suspendieron en 100  $\mu$ l de DMEM libre de FBS y factores de crecimiento. Las suspensiones celulares se inyectaron por vía subcutánea en los flancos derecho e

izquierdo de ratones atímicos (BALB/c-nu/nu) de 4 a 6 semanas de edad. Seis semanas después del trasplante, los ratones fueron sacrificados y los tejidos tumorales recolectados. Los tumores fueron digeridos con solución de Dispasa (1 mg/ml, Invitrogen) y Colagenasa tipo I al 0,5% (Invitrogen). Posterior a la disociación, nuevas esferas fueron generados e inyectados en ratones nu-nu, bajo el mismo procedimiento. Parte de los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10%, se embebieron en parafina y seccionaron con micrótopo rotatorio para su posterior evaluación histológica. La identificación de células que expresan citoqueratinas epiteliales de células diferenciadas se realizó con el anticuerpo anti-citoqueratina AE1/3, descrito anteriormente.

**Análisis del perfil de expresión génica.** El ARN total se extrajo empleando el kit AllPrep ADN/ARN (Qiagen). La transcripción inversa se realizó con el kit de amplificación MessageAmp™ II Arna (Ambion). Las sondas de cADN de las células cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes fueron marcadas con los colorantes Cy3 y Cy5 (Ambion), respectivamente. Las sondas marcadas se hibridaron en un microarreglo de cADN de la Universidad de Stanford con aproximadamente 40.000 oligonucleótidos inmovilizados. Las sondas mezcladas en 45 µl de tampón de hibridación DIG Easy Hyb (Roche) se incubaron a 37 °C durante 16 h. Después de la hibridación, las láminas del microarreglo se lavaron con 0,1 X SSC / 0.1% SDS, 0,1 X SSC y 0,01 X SSC durante 5 min a temperatura ambiente. La intensidad de fluorescencia se midió por separado con el escáner GenePix 4100A Array (Axon Instruments, CA, EE.UU.). Las imágenes y los datos de los niveles de expresión fueron procesados y analizados con el programa GenePix Pro V5.0 (Axon Instruments, CA, EE.UU.). A partir de 12.500 genes procesados, se seleccionaron

genes con niveles de expresión modificados por un factor superior a 1,5 o inferior a – 1,5 al comparar células derivadas de agregados celulares no adherentes (muestra) con células derivadas de monocapa (control). Un total de 638 genes para HeLa y 857 genes para SiHa se analizaron empleando el programa WebGestalt. Se realizaron dos experimentos independientes.

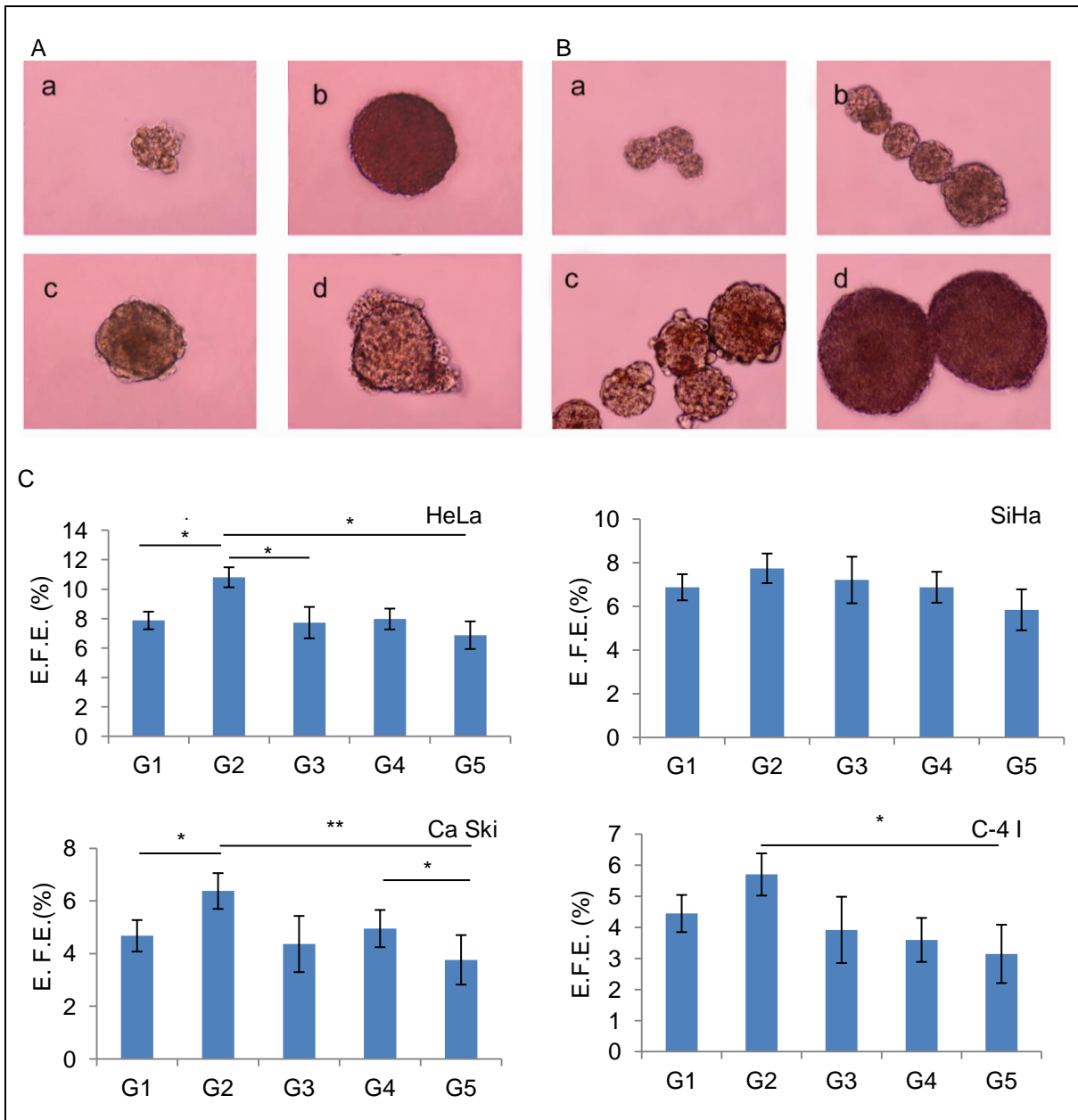
**Ensayo de radioresistencia.** Poblaciones celulares cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes fueron disociadas con solución de EDTA 1.0 mM y tamizadas con malla celular de 40  $\mu$ m. Posterior al conteo celular, las suspensiones celulares, en DMEM, fueron irradiadas a una tasa de 240 cGy/min durante el tiempo necesario para generar las dosis de 2, 4, 6, 8 y 10 Gy con un acelerador lineal Clinac 2100C (Varian Medical Systems, CA, EE.UU.), operando a 6 MV. Posterior a la irradiación, se realizaron ensayos de formación de colonias en agar blando, de acuerdo al procedimiento previamente descrito. La fracción de sobrevivencia (FS) se normalizó contra los controles no irradiados en cada dosis. El ajuste de los datos se realizó empleando el modelo lineal-cuadrático donde  $FS = \exp(-\alpha d - \beta d^2)$ , siendo  $\alpha$  el número células muertas por Gy en la parte lineal de la curva, y  $\beta$  el número de células muertas por  $Gy^2$  en el componente cuadrático de la curva. Tres experimentos independientes se llevaron a cabo.

**Análisis estadístico.** Los resultados se presentan como media y las diferencias de las medias con desviaciones estándar (DE). Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba t de Student no pareada. Los datos fueron procesados en el programa Minitab 15™. La significación estadística fue  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

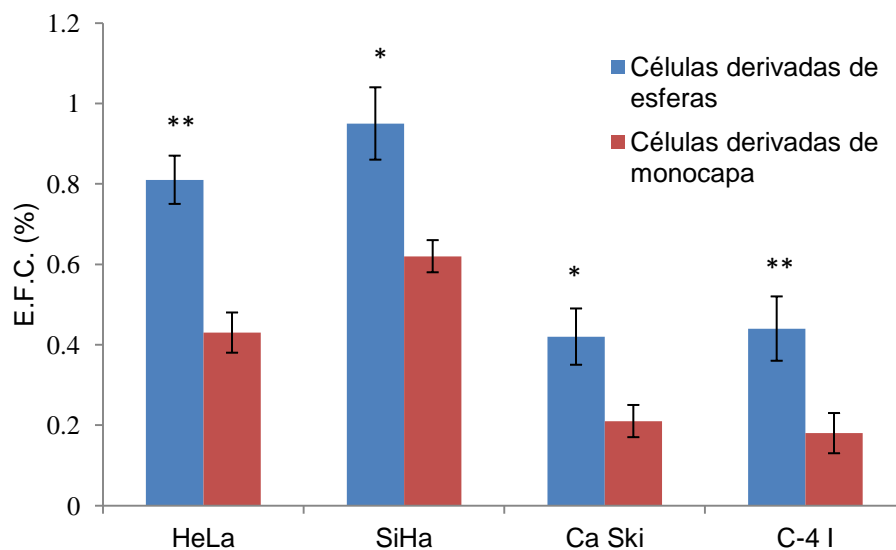
**Una población celular con habilidad de generar agregados celulares no adherentes, con capacidad de autorenovar *in vitro* y mayor eficiencia de formación de colonias, está presente en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino.** Las líneas celulares derivadas de carcinomas escamosos (SiHa, Ca Ski, y C-4 I) y adenocarcinomas (HeLa) fueron cultivadas en suspensión a baja concentración celular en medio específico para el crecimiento de células troncales/progenitoras. Siete días después de la siembra, se observaron agregados celulares no adherentes con diferentes fenotipos morfológicos (Fig. 2A), similares a los aislados en tejidos tumorales primarios y líneas celulares humanas derivadas de cáncer cérvico uterino.[56, 57] Todas las esferas incrementaron progresivamente de diámetro (Fig. 2B). La eficiencia de formación de esferas en la primera generación fue de  $7,8 \pm 0,69\%$  (media  $\pm$  DE, n = 10 experimentos independientes) para HeLa,  $6,8 \pm 0,57\%$  para SiHa,  $4,7 \pm 0,34\%$  para el Ca Ski, y  $4,4 \pm 0,54\%$  para C-4 I, respectivamente (Fig. 2C). Después de 7 días de cultivo, las esferas primarias fueron recolectadas, disociadas y re-sembradas a baja concentración celular a fin de generar esferas secundarias o de segunda generación. La eficiencia fue más alta en la segunda generación sin embargo, aunque este aumento no persistió en las siguientes generaciones, las esferas fueron propagadas de manera seriada hasta 10 generaciones, y

aproximadamente entre el 1–5% de la población se mantuvo en cultivo como esferas, proporcionando evidencia definitiva de su capacidad de autorenovación *in vitro*. Adicionalmente, cuando las esferas se cultivaron en medio suplementado con suero, las células se adhirieron a la superficie, adquirieron morfología epitelial y sobrevivieron durante varias generaciones en cultivo. Como era de esperar, al examinar las esferas en condiciones de diferenciación con los marcadores CD49f y CD133, la expresión se redujo o perdió, semejante a lo observado con células cultivadas en monocapa. Por último, las células derivadas de esferas diferenciadas presentaron positividad frente a la mezcla de citoqueratinas de diferenciación epitelial AE1/3. Estos datos en conjunto indican que una población celular minoritaria tiene capacidad de autorenovar y diferenciar *in vitro* asumiendo un fenotipo epitelial. Finalmente, se determinó la capacidad de formación de colonias en agar blando. Las células derivadas de esferas presentaron una capacidad proliferativa 1,9, 1,5, 2,0 y 2,4 veces mayor en HeLa, SiHa, Ca Ski y C-4 I respectivamente, en comparación con sus homólogas cultivadas en monocapa. Las células derivadas de esferas de SiHa presentaron mayor eficiencia de formación de colonias en agar blando ( $0,95 \pm 0,09\%$ ) respecto a HeLa ( $0,81 \pm 0,06\%$ ), C-4 I ( $0,44 \pm 0,08\%$ ), y Ca Ski ( $0,42 \pm 0,07\%$ ) (media  $\pm$  DE, n = 3). A su vez, estas cifras fueron significativamente mayores a las obtenidas a partir de células cultivadas en monocapa ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ), (Fig. 3). Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que los agregados celulares no adherentes se encuentren enriquecidos en células tumorigénicas.



**Figura 2** – Cultivo de agregados celulares no adherentes derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino, y medida de su capacidad de autorenovación *in vitro*. A, Morfología de células cultivadas en condiciones independientes de anclaje como agregados celulares no adherentes una semana después de la siembra, HeLa (a), SiHa (b), Ca Ski (c), y C-4 I (d). Aumento 10x, tamaño de barra = 100  $\mu$ m. B, Fotografías seriadas durante el cultivo, mostrando aumento progresivo en el

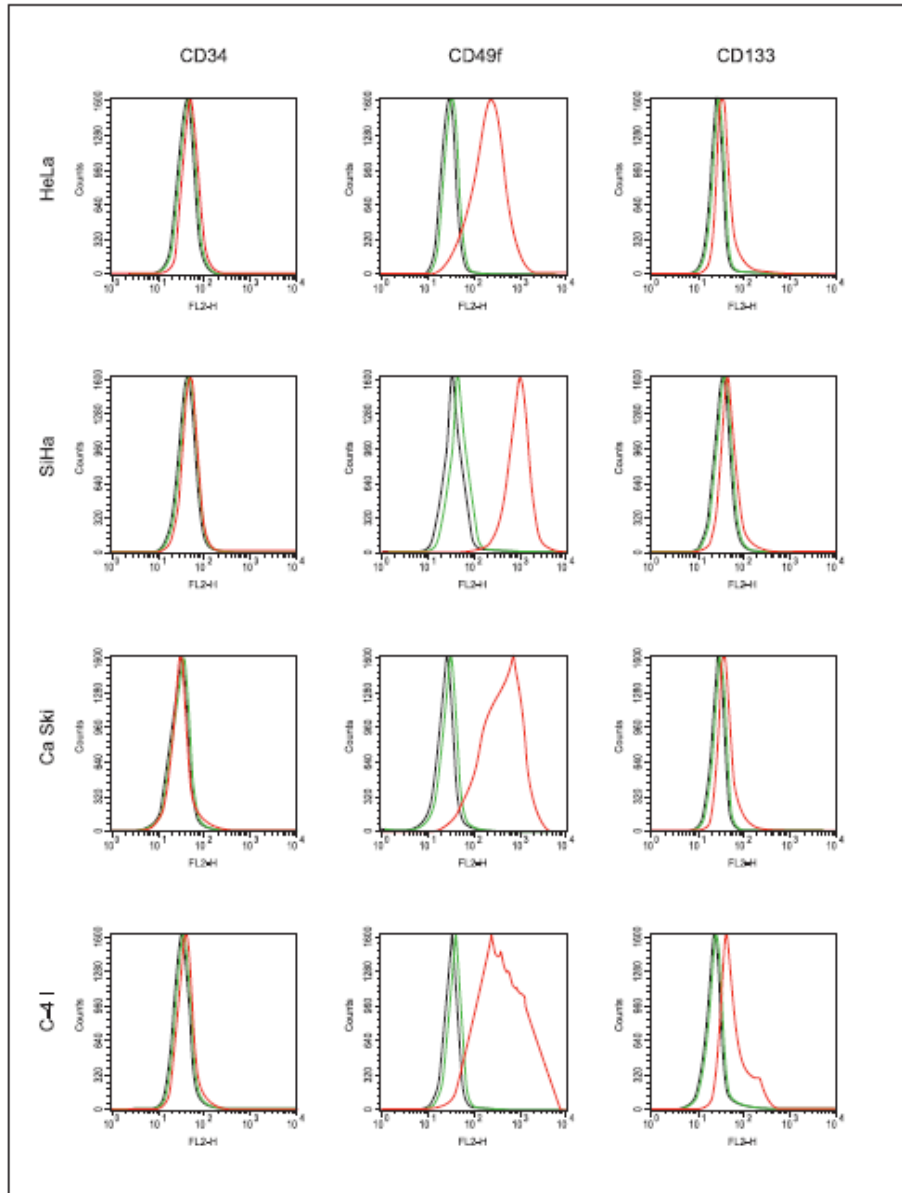
diámetro de las esferas a los 4 (a), 8 (b), 12 (c) y 16 días (d). Aumento = 10x, tamaño de barra = 100  $\mu$ m. C, Eficiencia de formación de esferas (E.F.E.) de la primera a la quinta generación (G1-G5). Las células fueron sembradas a una concentración de 100 células/pozo en 200  $\mu$ l de medio libre de suero, el conteo de esferas se realizó a los siete días. Las barras representan la media de la eficiencia, calculada como el número de esferas formadas, dividido por el número inicial de células sembradas por pozo y presentado como porcentaje. Las líneas verticales representan la desviación estándar, n = 3, \* p < 0,05 y \*\* p < 0,005.



**Figura 3** – Eficiencia de formación de colonias en agar blando de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. La barra representa la media para la eficiencia de formación de colonias, calculada como en número de colonias formadas, dividido por el número inicial de células sembradas en cada pozo y presentado como porcentaje. La línea vertical representa la desviación estándar, n = 3, \* p < 0.05 y \*\* p < 0.005.

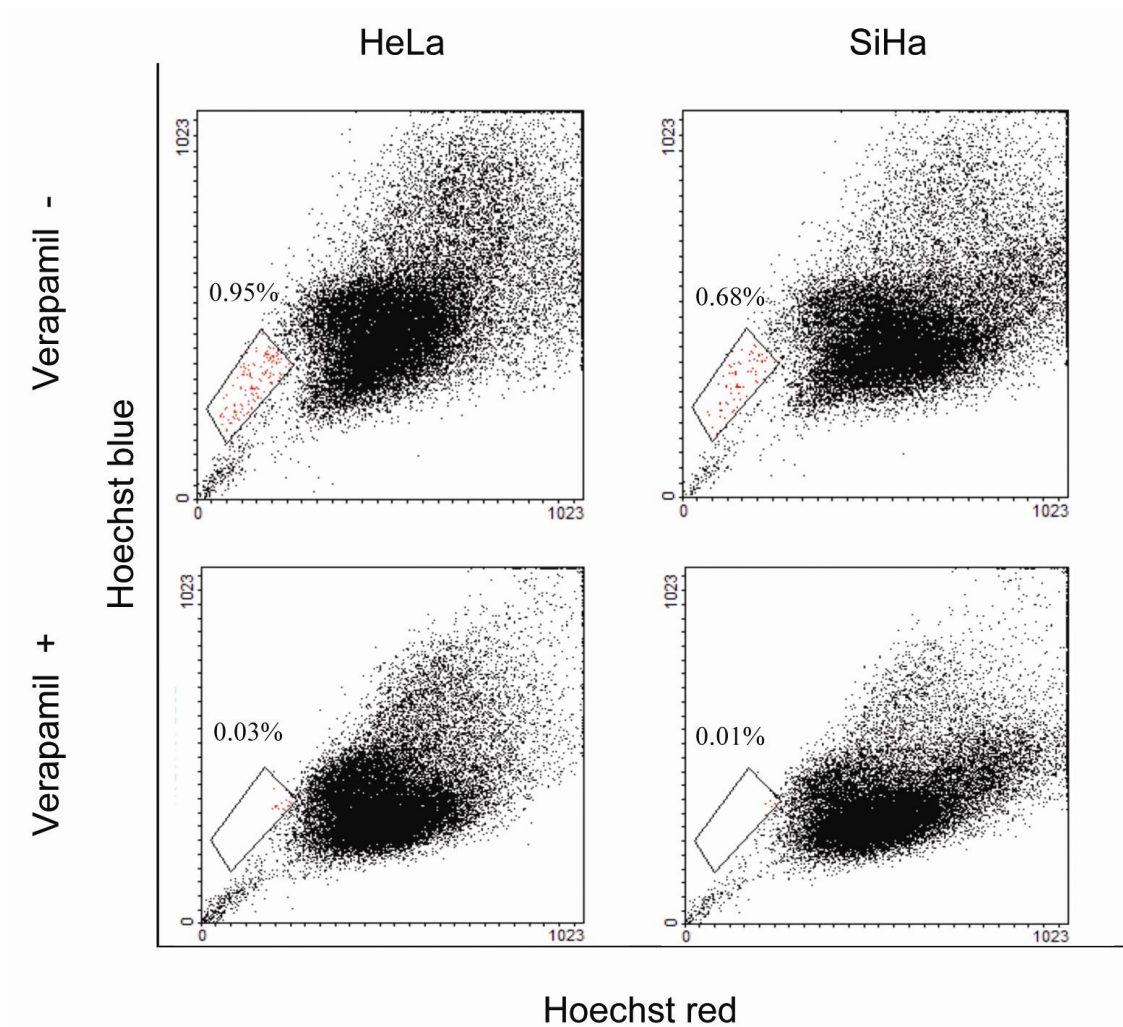
**Las células derivadas de esferas expresan el antígeno de superficie CD49f.** Las células derivadas de esferas fueron analizadas para la expresión de los marcadores de células tumorigénicas CD34, CD49f y CD133.[4, 5, 9, 58, 59] El inmunoanálisis por citometría de flujo permitió identificar que en las células derivadas de esferas más del 90% de la población expresa el antígeno de superficie CD49f, una minoría es positiva para CD133 y la totalidad la población no expresa el antígeno CD34. En concreto, CD49f fue expresado en el  $91,67 \pm 2,31\%$ ,  $98,77 \pm 3,47\%$ ,  $92,33 \pm 8,39\%$  y  $96,72 \pm 4,09\%$  (media  $\pm$  DE, n = 3) de HeLa, SiHa, Ca Ski, y C-4 I, respectivamente. Las células derivadas de esferas CD133 positivas correspondieron al  $4,67 \pm 4,73\%$ ,  $9,28 \pm 3,15\%$ ,  $18,36 \pm 0,16\%$ , y  $61,45 \pm 2,26\%$  (media  $\pm$  DE, n = 3) de HeLa, SiHa, Ca Ski, y C-4 I, respectivamente. Al igual que otros estudios, poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas provenientes de tejido cérvico uterino [56] y endometrial [65-67] no presentaron expresión del antígeno CD34. El inmunoanálisis de células cultivadas en monocapa y células derivadas de esferas cultivadas en condiciones de diferenciación permitió identificar el bajo nivel de expresión de los tres marcadores evaluados en las cuatro líneas celulares, menor al 2%, excepto en SiHa para el antígeno CD49f ( $13,68 \pm 2,79\%$ , media  $\pm$  DE, n = 3, Fig. 4). Estos resultados sugieren que los agregados celulares no adherentes están enriquecidos en células que expresan el antígeno de superficie CD49f.





**Figura 4** – Inmunofenotipo de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. Células provenientes de las dos condiciones fueron analizadas por citometría de flujo con los anticuerpos monoclonales CD34, CD49f, y CD133. La línea roja corresponde a células cultivadas en condiciones no adherentes, la línea verde a células cultivadas en condiciones adherentes, y la línea de negra al control de isotipo.

**Líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino presentan una población minoritaria que excluye el colorante Hoechst 33342.** Las células troncales somáticas tienen la capacidad de facilitar la salida de ciertos fármacos lipofílicos, debido a la expresión de proteínas de la familia ABC (por sus siglas en inglés de *ATP-binding cassette*) de transportadores.[17] El  $1,1 \pm 0,19\%$  de HeLa (media  $\pm$  DE, n = 3) y el  $0,7 \pm 0,08\%$  de SiHa presentaron el fenotipo característico de las poblaciones celulares SP, por sus siglas en inglés de *Side population* (Fig. 5), confirmando que las líneas celulares contienen al menos dos poblaciones celulares fenotípicamente distintas relacionadas con su capacidad de excluir colorantes vitales y por ende, con características propias de células tumorigénicas.



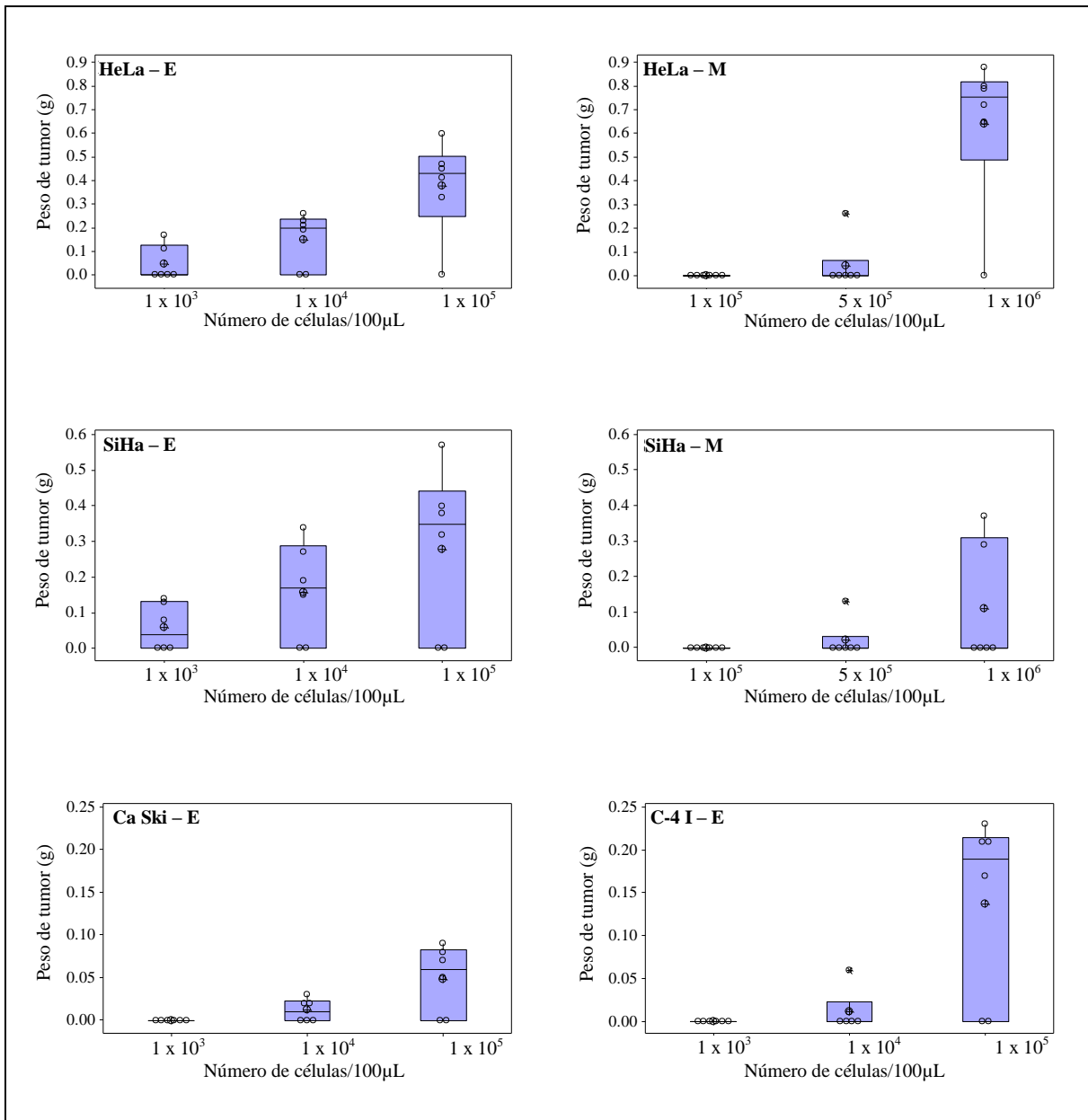
**Figura 5** – Identificación de la población marginal o *Side population* en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Células HeLa y SiHa fueron incubadas durante 90 min a 37°C con el colorante Hoechst 33342 de acuerdo al procedimiento descrito por Goodell y cols.[17] La región delimitada representa la fracción *Side population* con y sin Verapamilo.

**Las células derivadas de esferas presentan mayor capacidad tumorigénica que las células cultivadas en monocapa.** Las poblaciones celulares aisladas mediante cultivos libres de suero y por técnicas de MACS y/o FACS fueron evaluadas *in vivo* por su habilidad de

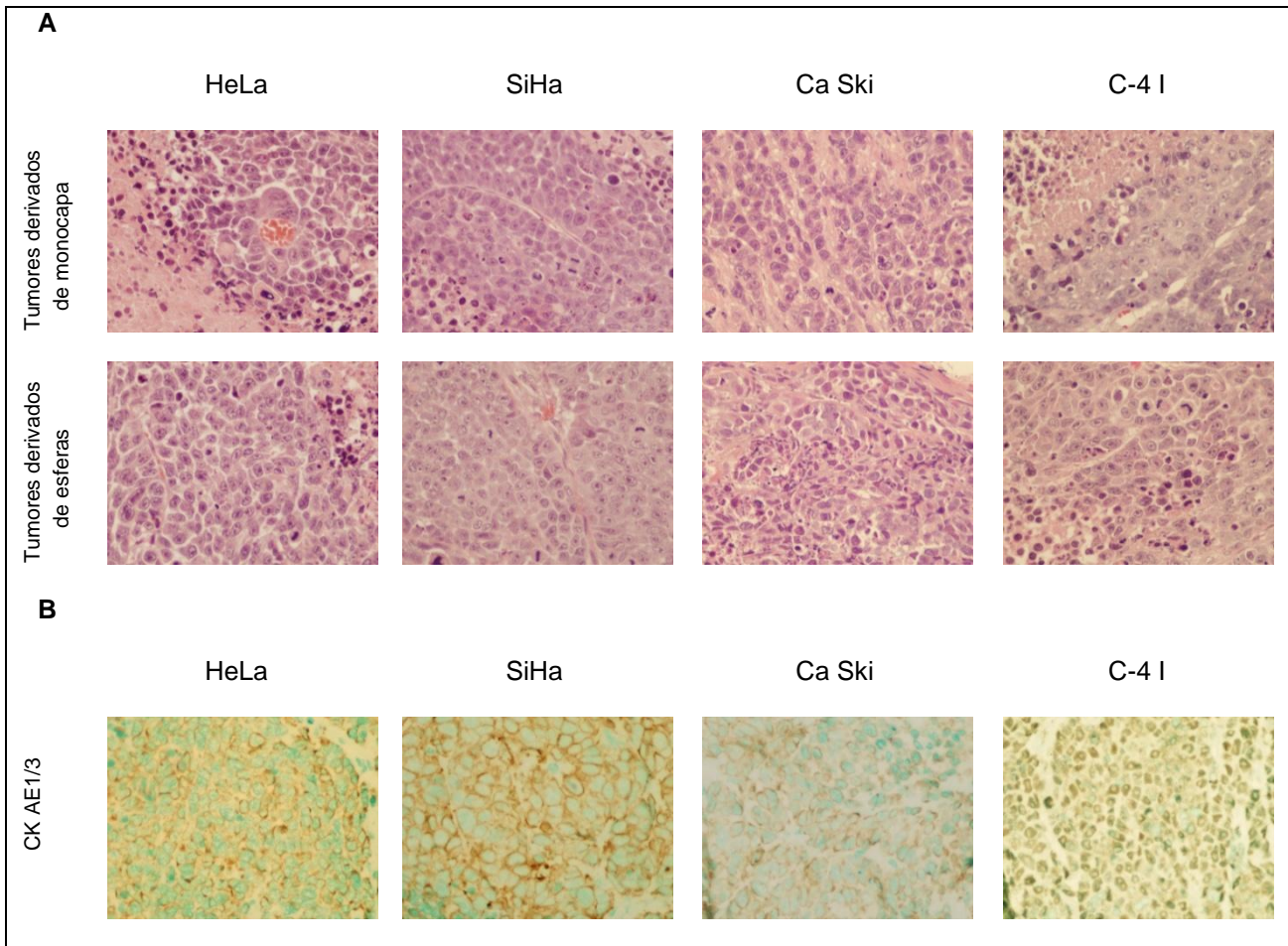
generar y recapitular de manera continua tumores en ratones atímicos, característica que define experimentalmente una población de células tumorigénicas.[8, 10, 13, 21]  $1 \times 10^4$  células  $SP^+$  derivadas de HeLa formaron tumor en uno de dos sitios de inyección mientras que, la misma cantidad de células  $CD34^+$ ,  $CD44^+$  y  $CD133^+$  permanecieron no tumorigénicas tanto en HeLa como en SiHa. La inyección de  $1 \times 10^3$  células  $CD49f^+$  fueron tumorigénicas en 1/6 y 2/6 ratones, en HeLa y SiHa, respectivamente, similar capacidad tumorigénica presentaron las células derivadas de esferas en ratones atímicos con la misma concentración celular. Por su parte,  $1 \times 10^4$  células provenientes de esferas de Ca Ski y C-4 I generaron tumores mientras que  $1 \times 10^6$  células cultivadas en monocapa se mantuvieron no tumorigénicas (Tabla 3). Células HeLa y SiHa cultivadas bajo condiciones normales de adherencia fueron capaces de producir tumores con al menos  $5 \times 10^5$  células, no así el caso de Ca Ski y C-4 I, incluso con tiempo de latencia prolongado (10 semanas). Los tumores generados a partir de esferas presentaron un aumento progresivo de peso en asociación con el número de células inyectadas (Fig. 6). Todos los tumores fueron detectados por inspección visual y palpación, excepto los tumores formados con  $1 \times 10^4$  células  $SP^+$ , detectados en la necropsia. Los tumores obtenidos a partir de células provenientes de esferas fueron clasificados como carcinomas pobremente diferenciados (grado 1/grado 2), con características histológicas similares a los tumores generados con células cultivadas en monocapa, incluida la expresión de citoqueratina humana AE1/3 (Fig. 7).

Población	Células	Tumores/inyecciones			
		HeLa	SiHa	Ca Ski	C-4 I
Células derivadas de agregados celulares no adherentes	$1 \times 10^3$	2/6	3/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^4$	4/6	4/6	3/6	2/6
	$1 \times 10^5$	5/6	4/6	4/6	4/6
Células derivadas de cultivos en monocapa	$1 \times 10^5$	0/6	0/6	0/6	0/6
	$5 \times 10^5$	1/6	1/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^6$	5/6	2/6	0/6	0/6

**Tabla 3** – Tumorigenicidad de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. La capacidad de formación de tumores de las poblaciones celulares se evaluó por inyección subcutánea de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ , y  $1 \times 10^5$  células derivadas de esferas y  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ , y  $1 \times 10^6$  células derivadas de monocapa en ratones nu-nu. El número de tumores formados y el número de inyecciones realizados se indican para cada condición como número fraccionario.



**Figura 6** – Pesos de tumores derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. La capacidad de formación de tumores se evaluó por inyección subcutánea de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ , y  $1 \times 10^5$  células derivadas de esferas y  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ , y  $1 \times 10^6$  células derivadas de monocapa en ratones nu-nu. Células Ca Ski y C-4 I derivadas de monocapas no generaron tumores a las concentraciones celulares mencionadas. Abreviaturas: E, células derivadas de esferas; M, células derivadas de monocapa.



**Figura 7** – Inmunohistoquímica de tumores derivados de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. A, Tinción de H&E en cortes tumorales generados a partir de células derivadas de esferas y monocapas. Todos los tumores fueron clasificados como carcinomas pobremente diferenciados. Aumento = 40x. B, Tinción con el anticuerpo humano anti-citoqueratinas AE1/3 en tumores generados a partir de células derivadas de esferas.

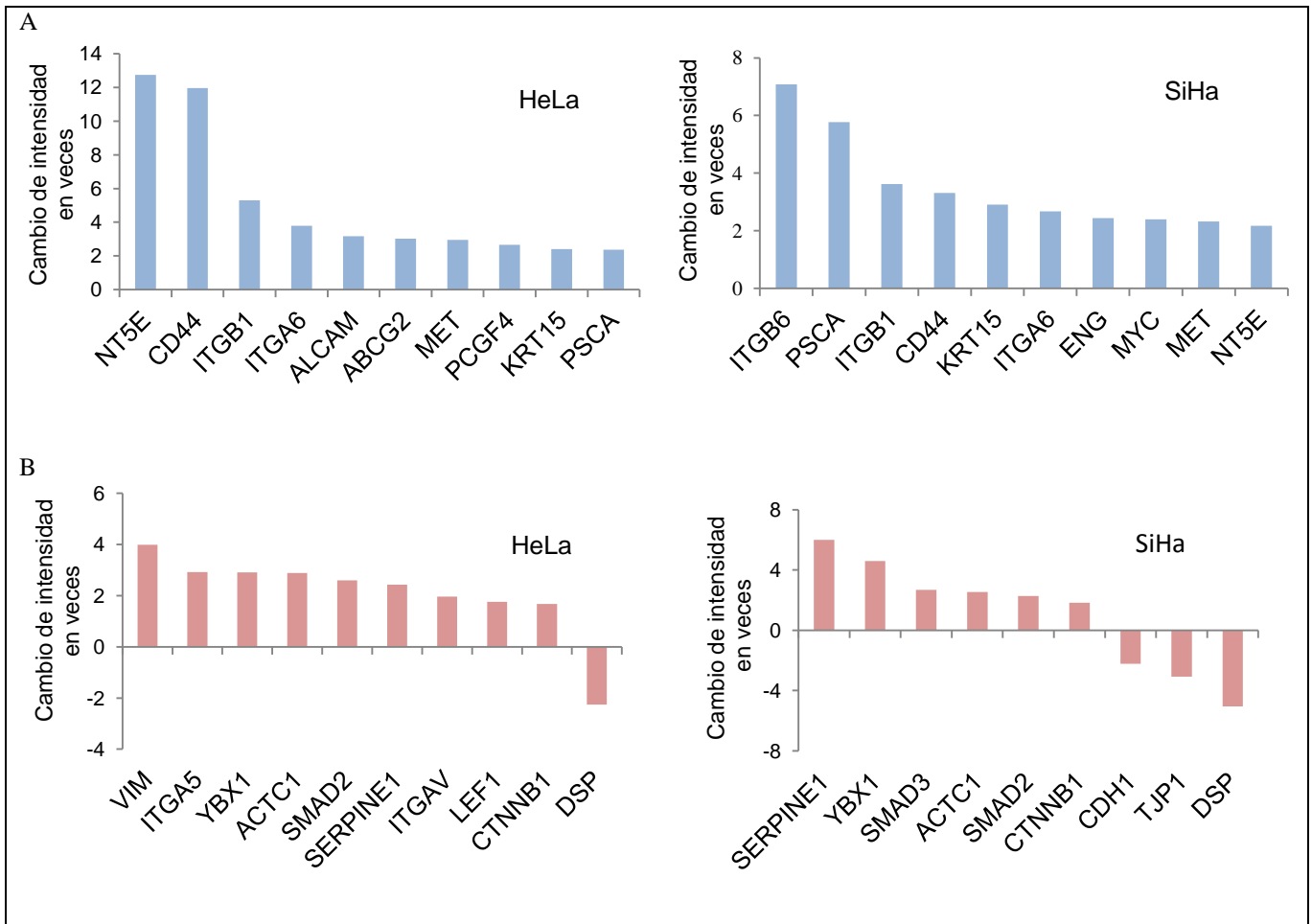
Adicionalmente, se realizaron trasplantes consecutivos con el fin de verificar la capacidad de autorenovación *in vivo* de las poblaciones celulares evaluadas. Inicialmente, piezas de

tumor de 1 mm generadas a partir de células provenientes de esferas de HeLa se injertaron subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, a partir de la cuarta semana del trasplante se observó la aparición de tumores con un total de cuatro trasplantes seriados exitosos. Posteriormente, células disociadas de tumores generados con células derivadas de esferas de HeLa pudieron generar nuevamente esferas en medio libre de suero con factores de crecimiento.  $1 \times 10^4$  células disociadas provenientes de estas esferas fueron inyectadas por vía subcutánea dando lugar a tumores en ratones atímicos con menores tiempos de latencia. Estos resultados indican que las células derivadas de esferas tienen la habilidad de generar y recapitular de manera continua tumores en ratones atímicos.

**Las células derivadas de agregados celulares no adherentes presentan expresión de genes asociados a células troncales.** Posterior a la demostración de la capacidad tumorigénica de las poblaciones celulares previamente aisladas, fue examinado el perfil de expresión génica de células derivadas de esferas y monocapas a través de un microarreglo de cADN. El análisis identificó 767 y 547 genes con expresión diferencial entre células derivadas de esferas y monocapas en HeLa y SiHa, respectivamente. Algunos marcadores de células troncales somáticas comúnmente identificados en órganos del sistema reproductivo femenino presentaron mayor expresión en células derivadas de esferas, tales como *CD44* [22, 29, 38, 56, 65], *ITGB1* (CD29) [65, 66], *PSCA* [45], *NT5E* (CD73) [65-67], *ENG* (CD105) [65, 67], *MYC* (c-Myc) [56], *PCGF4* (IMC-1) [22, 26], y *ABCG2* [22, 33, 68, 69]. Adicionalmente, marcadores de células troncales epiteliales sobre-

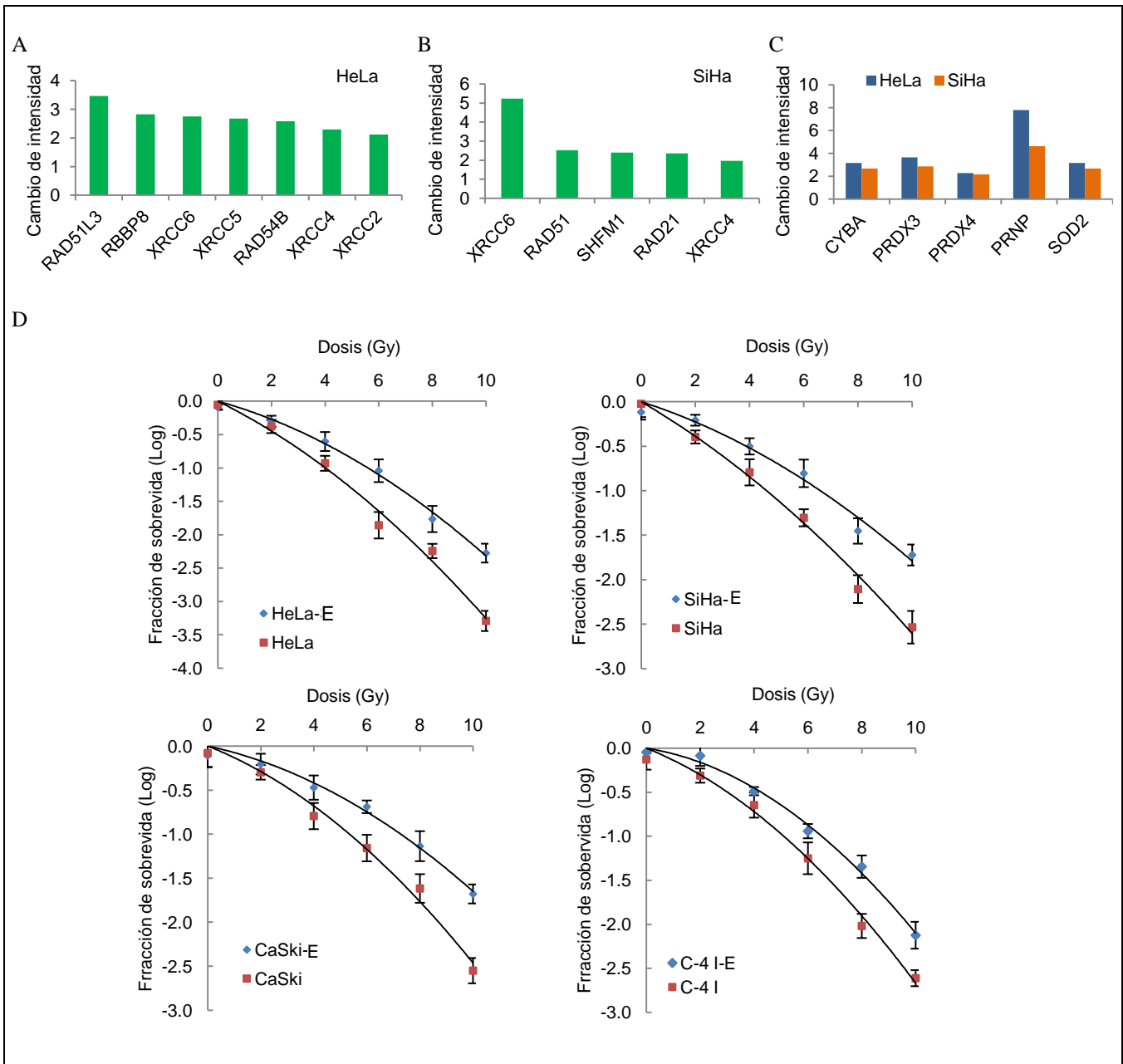


expresados en las poblaciones celulares derivadas de esferas incluyeron *ITGB6* [70], *ALCAM* (CD166) [10, 71], *MET* (c-Met) [72], y *KRT15* [73] (Fig. 8A). Otros genes sobreexpresados en esferas fueron asociados a la transición epitelio-mesenquimal (*SERPINE1*, *YBX1*, *SMAD3*, *ACTC1*, *SMAD2*, *CTNNB1*, *CDH1*, *TJP1*, *DSP*, *VIM*, *ITGA5*, *ITGAV* y *LEF1*, Fig. 8B); a la reparación de la doble cadena de ADN (*XRCC6*, *XRCC5*, *XRCC4* y *XRCC2*, relacionados con la unión de extremos no homólogos y *RAD51*, *RAD51L3*, *RBBP8*, *RAD21*, *RAD54B* y *SHFM1*, relacionados con la reparación por recombinación homóloga; Figs. 9A y 9B); y al metabolismo de especies reactivas del oxígeno (*CYBA*, *PRDX3*, *PRDX4*, *PRNP*, y *SOD2*, Fig. 9C); para información más detallada ver anexos 1 y 2.



**Figura 8** – Expresión diferencial de genes asociados a células troncales y a la transición epitelio-mesenquimal en líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones no adherentes. A, Expresión de marcadores de células troncales tumorales en células HeLa y SiHa derivadas de agregados celulares no adherentes. B, Expresión de marcadores asociados a la transición epitelio-mesenquimal en células HeLa y SiHa derivadas de agregados celulares no adherentes. Las barras representan la media del cambio de intensidad en células derivadas de esferas comparado con células cultivadas en monocapa. Los datos provienen de dos experimentos independientes.

**Las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas presentan mayor grado de radioresistencia respecto a las células cultivadas en monocapa.** El análisis de expresión génica permitió identificar un incremento en la expresión de genes asociados con la reparación de ADN y el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en las células derivadas de esferas, por tal motivo evaluamos la sensibilidad de estas poblaciones celulares frente al tratamiento con rayos X. Como era de esperar, todas las poblaciones celulares evaluadas presentaron una disminución progresiva en la tasa de supervivencia con el aumento en la dosis de radiación. Las tasas de supervivencia de las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas fueron significativamente mayores a las tasas de las poblaciones celulares cultivadas en monocapa (células HeLa derivadas de monocapa, media de la tasa de supervivencia a 2 Gy ( $FS_{2Gy}$ ) =  $0,42 \pm 0,06$  frente a células derivadas de esferas  $FS_{2Gy} = 0,60 \pm 0,11$ ,  $p = 0,05$ ; células SiHa derivadas de monocapa,  $FS_{2Gy} = 0,56 \pm 0,10$  frente a células derivadas de esferas  $FS_{2Gy} = 0,65 \pm 0,09$ ,  $p < 0,001$ ; células Ca Ski derivadas de monocapa,  $FS_{2Gy} = 0,59 \pm 0,04$  frente a células derivadas de esferas  $FS_{2Gy} = 0,76 \pm 0,06$ ,  $p = 0,02$ ; células C-4 I derivadas de monocapa,  $FS_{2Gy} = 0,39 \pm 0,05$  frente a células derivadas de esferas  $FS_{2Gy} = 0,53 \pm 0,02$ ,  $p = 0,02$ ;  $n = 3$ , prueba t de Student bilateral, Fig. 8D y Tabla 4). Estos resultados apoyan el papel de las células tumorigénicas en la radioresistencia de tumores malignos.



**Figura 9** – Respuesta a la radiación ionizante de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. A, Genes de reparación de ADN con expresión diferencial en poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas derivadas de HeLa. B, Como en A, pero con células derivadas de SiHa. C, Genes asociados al metabolismo de especies reactivas del oxígeno con expresión diferencial poblaciones celulares enriquecidas con

células tumorigénicas provenientes de HeLa y SiHa. D, Curvas de sobrevivencia de las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas y de las poblaciones celulares en monocapa. Las células fueron disociadas e irradiadas en suspensión a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy con un acelerador lineal Clinac 2100C a 200cGy/min y 6mV. Posteriormente, fueron sembradas en placas de seis pozos con DMEM y agar noble (0,3%). Veintiún días después de la irradiación, las colonias formadas fueron fijadas, teñidas y contadas. Las fracciones de sobrevivencia fueron normalizadas con los correspondientes controles sin irradiar. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los datos son representativos de tres experimentos independientes; Abreviaturas: S, células derivadas de esferas.

Línea	$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )		$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )		FS <sub>2</sub>	
	M	E	M	E	M	E
HeLa	0.166 ± 0.044	0.082 ± 0.017	0.011 ± 0.006	0.013 ± 0.007	0.42 ± 0.06	0.60 ± 0.11
SiHa	0.099 ± 0.021	0.070 ± 0.011	0.013 ± 0.004	0.016 ± 0.005	0.56 ± 0.10	0.65 ± 0.09
Ca Ski	0.087 ± 0.032	0.032 ± 0.007	0.012 ± 0.000	0.013 ± 0.008	0.59 ± 0.04	0.76 ± 0.06
C-4 I	0.151 ± 0.075	0.115 ± 0.029	0.009 ± 0.003	0.011 ± 0.005	0.39 ± 0.05	0.53 ± 0.02

**Tabla 4** – Parámetros de respuesta a la radiación ionizante de líneas celulares de cáncer cérvico uterino cultivadas en condiciones adherentes y no adherentes. Los parámetros de las curvas de sobrevivencia se calcularon a través del modelo lineal-cuadrático  $FS = \exp(-\alpha d - \beta d^2)$ , en donde  $\alpha$  es el número de células muertas por Gy en la parte lineal de la curva de sobrevivencia,  $\beta$  es el número de células muertas por Gy<sup>2</sup> en el componente cuadrático de la curva de sobrevivencia. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Abreviaturas: E, células derivadas de esferas; M, células derivadas de monocapa.

## **DISCUSIÓN**

El presente estudio describe el aislamiento de poblaciones celulares tumorigénicas, con características propias de células troncales, presentes en las líneas celulares cérvico uterinas HeLa, SiHa, Ca Ski y C-4 I. Recientemente, algunos estudios han evidenciado la existencia de poblaciones celulares tumorigénicas con propiedades biológicas de células troncales, empleando para tal fin antígenos de superficie, tinción de Hoescht, formación de esferas y marcadores de células troncales sin embargo, pocos trabajos evalúan su capacidad de formación de tumores *in vivo* o presentan una caracterización más completa que permita un mejor entendimiento de su biología.[56, 57] A nuestro entender, este trabajo presenta la primera caracterización de células tumorigénicas en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. De acuerdo con los criterios previamente establecidos para identificar poblaciones celulares candidatas, [3, 74] encontramos poblaciones celulares minoritarias con capacidad de autorenovación *in vitro* e *in vivo* (criterios a y b); estas poblaciones celulares fueron más tumorigénicas respecto a la población total, dando lugar a tumores histológicamente idénticos a los generados a partir de las líneas celulares cultivadas en monocapa (criterio c); la capacidad de diferenciación fue evidenciada por medio de tinciones con citoqueratinas (criterio d); y por último, las poblaciones celulares expresaron el antígeno de superficie celular CD49f (criterio e), característico de células tumorigénicas epiteliales.

Las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas fueron aisladas a partir de cultivos *in vitro* en presencia de factores de crecimiento y ausencia de suero fetal. En estas condiciones, alrededor del 10% de las células provenientes de líneas derivadas de cáncer cérvico uterino generaron agregados celulares no adherentes al cabo de una semana de crecimiento. Las esferas se caracterizaron por su enriquecimiento en el antígeno de superficie CD49f, o integrina alfa 6, localizada principalmente en capas basales de epitelios estratificados. Recientemente, se ha reportado el enriquecimiento de esta integrina en agregados celulares no adherentes derivados de cáncer de mama, cuyo bloqueo con ARN de interferencia, resulta en la disminución del número de esferas y su capacidad tumorigénica.[60] Es de resaltar que CD49f (*ITGA6*), es una integrina referenciada como receptor primario en la infección natural de virus del papiloma humano [75-77] por lo tanto, postulamos que las células de reserva adultas con expresión preferencial de CD49f podrían ser blancos de los tipos virales de alto riesgo en la carcinogénesis cérvico uterina.

Diferentes clases de marcadores de células troncales fueron identificados en los agregados celulares, tales como las integrinas alfa 6 o CD49f (*ITGA6*), beta 1 o CD29 (*ITGB1*), y beta 6 (*ITGB6*); los antígenos de superficie CD44, CD73 (*NT5E*), CD105 (*ENG*), CD166 (*ALCAM*) y *PSCA*; genes asociados a bombas de membrana para exclusión de xenobióticos como *ABCG2*; y proto-oncogenes como c-Myc (*MYC*), c-Met (*MET*), y Bmi-1 (*PCGF4*). En adición, diversos marcadores de células tumorigénicas comúnmente identificados en órganos del sistema reproductivo femenino presentaron mayor expresión en células derivadas de esferas, como *CD44*, identificado previamente en cáncer de

ovario, [22, 38] cáncer de endometrio, [29] y cáncer cérvico uterino [56]; *ITGB1* (CD29) identificado en cáncer de endometrio [65, 66]; *PSCA* en cáncer cérvico uterino [45]; *NT5E* (CD73) en cáncer de endometrio [65-67]; *ENG* (CD105) en cáncer de endometrio [65, 67]; *MYC* en carcinoma cérvico uterino [56]; *PCGF4* (Bmi-1) en cáncer de ovario, [22] cáncer de endometrio [26]; y *ABCG2* en cáncer de ovario [22, 33, 68] y cáncer de miometrio.[69] Otros marcadores de células troncales epiteliales incluyeron *ITGB6*, también expresado en cáncer de boca [70]; *ALCAM* (CD166) en cáncer colorectal [10, 71]; *MET* y *KRT15* en cáncer de próstata [72, 73]; y *ITGA6* (CD49f) en cáncer de mama, [60] y piel [58, 59].

Recientemente, se ha reportado que la inducción de la TEM en células de mama inmortalizadas condujo a la adquisición del inmunofenotipo celular  $CD44^+/CD24^-$ , característico de células tumorigénicas de mama.[53] En HeLa, la eficiencia de formación de esferas y la expresión de CD44 fue significativamente elevada cuando Twist, un factor de transcripción que participa en la TEM, fue sobre-expresado.[55] Las poblaciones celulares aisladas en el presente trabajo también expresaron marcadores característicos de la TEM asociados a uniones estrechas, *TJP1* (ZO-1), uniones adherentes, *CDH1* (Cadherina epitelial o E-Cadherina), y desmosomas, *DSP* (Desmoplaquina), conjunto de genes cuya expresión génica disminuye en la transición. De otro lado, es característica la sobre-expresión de genes relacionados con adhesión a matriz extracelular, tales como las integrinas alfa V, alfa 5, beta 1 y beta 6, genes sobre-expresados en células derivadas de agregados no adherentes. Igualmente, aumentó la expresión de genes asociados al citoesqueleto contráctil, es el caso de *ACTA* (alfa-Aactina), *CTNB* (beta-Catenina) y *VIM* (Vimentina). Algunos factores de transcripción asociados a la TEM y sobre-expresados en



las esferas fueron: *SMAD3/4*, involucrados en la cascada de señalización del factor de crecimiento transformante beta, *LEF-1*, cofactor de beta-Catenina, y *YBX1*, activador de Snail-1, represor transcripcional de E-cadherina. Estos hallazgos, sumados a lo observado en células derivadas de esferas provenientes de cáncer de ovario,[78] y células MCF-7/ADR previamente seleccionadas con Doxorubicina,[79] señalan que posiblemente la TEM ocurre en células tumorigénicas durante la progresión del cáncer.[28]

Otra característica de las células tumorigénicas es su resistencia a la radiación, previamente evidenciado en cáncer de mama[80] y gliomas.[81] El análisis funcional *in vitro* mostró que las poblaciones celulares aisladas en medios selectivos, libres de suero y en presencia de factores de crecimiento, poseen mayor resistencia a la radiación ionizante respecto a las células en monocapa. Efectivamente, el perfil de expresión génica reveló sobre-expresión de genes involucrados en vías de reparación de ADN tales como los procesos de recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos así como, sobre-expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular e inducibles por daños a ADN (*GADD45A* y *PPP1R15A*), similar a lo reportado en células troncales embrionarias humanas.[82] Con relación a la radioresistencia de células tumorigénicas, recientemente Diehn y cols. [83] identificaron genes significativamente sobre-expresados en poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas de mama implicados en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, como *CYBA*, *SOD2* y *PRNP*, genes igualmente sobre-expresados en las poblaciones celulares aisladas en el presente estudio. En conjunto, estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que la expresión aumentada de defensas frente a las especies reactivas de oxígeno y de genes asociados a

la TEM [52] contribuyen a mejorar la tasa de supervivencia de células tumorigénicas y por ende, sus niveles de radioresistencia. El aislamiento y caracterización de células tumorigénicas permitirá identificar mecanismos moleculares involucrados en la génesis, promoción y progresión de las células tumorales y por lo tanto, posibilitará el desarrollo de terapias específicas contra este tipo de población, aumentando la eficacia y seguridad de las mismas, y disminuyendo las tasas de recidivas.

## **CONCLUSIONES**

Aislamos y caracterizamos poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas derivadas de líneas celulares de carcinomas escamosos y adenocarcinomas de cuello uterino. Estas poblaciones celulares fueron enriquecidas en medios selectivos como agregados celulares no adherentes, positivos para el antígeno de superficie CD49f. El estudio de tumorigenicidad evidenció que  $1 \times 10^3$  células derivadas de esferas generaron tumores en ratones nu-nu mientras,  $1 \times 10^5$  células derivadas de monocapa se mantuvieron no tumorigénica en las cuatro líneas celulares. Las poblaciones celulares aisladas pudieron ser trasplantadas de manera seriada, generando tumores compuestos por células que recapitulaban la diversidad fenotípica de los tumores generados a partir de las líneas celulares cultivadas en monocapa. Las poblaciones celulares sobre-expresaron marcadores de células troncales epiteliales y genes asociados a la transición epitelio-mesenquimal. De igual manera, se observó sobre-expresión de genes involucrados en la reparación del ADN y en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, cambios corroborados funcionalmente *in vitro* al evidenciarse una mayor radioresistencia de las poblaciones celulares enriquecidas con células tumorigénicas

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194: 23-8.
- [2] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414: 105-11.
- [3] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66: 9339-44.
- [4] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367: 645-8.
- [5] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3: 730-7.
- [6] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 3983-8.
- [7] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432: 396-401.
- [8] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65: 10946-51.
- [9] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445: 106-10.
- [10] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 10158-63.
- [11] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445: 111-5.
- [12] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 973-8.
- [13] Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67: 1030-7.
- [14] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1: 313-23.
- [15] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008;13: 153-66.
- [16] Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451: 345-9.
- [17] Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183: 1797-806.
- [18] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255: 1707-10.
- [19] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65: 5506-11.

- [20] Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17: 1253-70.
- [21] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005;65: 9328-37.
- [22] Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008;68: 4311-20.
- [23] Garraway IP, Sun W, Tran CP, Perner S, Zhang B, Goldstein AS, Hahm SA, Haider M, Head CS, Reiter RE, Rubin MA, Witte ON. Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. *Prostate* 2010;70: 491-501.
- [24] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127: 2893-917.
- [25] Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat Rev* 2008;34: 603-13.
- [26] Hubbard SA, Friel AM, Kumar B, Zhang L, Rueda BR, Gargett CE. Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 2009;69: 8241-8.
- [27] Friel AM, Sergeant PA, Patnaude C, Szotek PP, Oliva E, Scadden DT, Seiden MV, Foster R, Rueda BR. Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells. *Cell Cycle* 2008;7: 242-9.
- [28] Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y, Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Kato K, Hayashi S, Asanoma K, Wake N. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am J Pathol* 2010;176: 381-92.
- [29] Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, Eramo A, Napoletano C, Gallo D, Perillo A, Nuti M, Pierelli L, Testa U, Scambia G, Ferrandina G. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15: 4299-311.
- [30] Afify AM, Craig S, Paulino AF, Stern R. Expression of hyaluronic acid and its receptors, CD44s and CD44v6, in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Ann Diagn Pathol* 2005;9: 312-8.
- [31] Afify AM, Craig S, Paulino AF. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14: 328-33.
- [32] Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65: 3025-9.
- [33] Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 11154-9.
- [34] Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergeant PA, Koulouris CR, Friel AM, Roberts DJ, Seiden MV, Scadden DT, Rueda BR, Foster R. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 2009;27: 2875-83.
- [35] Baba T, Convery PA, Matsumura N, Whitaker RS, Kondoh E, Perry T, Huang Z, Bentley RC, Mori S, Fujii S, Marks JR, Berchuck A, Murphy SK. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene* 2009;28: 209-18.
- [36] Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, Perillo A, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Martinelli E, Rutella S, Paglia A, Zannoni G, Mancuso S, Scambia G. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18: 506-14.
- [37] Kusumbe AP, Mali AM, Bapat SA. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells* 2009;27: 498-508.
- [38] Alvero AB, Chen R, Fu HH, Montagna M, Schwartz PE, Rutherford T, Silasi DA, Steffensen KD, Waldstrom M, Visintin I, Mor G. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* 2009;8: 158-66.

- [39] Smedts F, Ramaekers F, Leube RE, Keijser K, Link M, Vooijs P. Expression of keratins 1, 6, 15, 16, and 20 in normal cervical epithelium, squamous metaplasia, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142: 403-12.
- [40] Ince TA, Cviko AP, Quade BJ, Yang A, McKeon FD, Mutter GL, Crum CP. p63 Coordinates anogenital modeling and epithelial cell differentiation in the developing female urogenital tract. *Am J Pathol* 2002;161: 1111-7.
- [41] Quade BJ, Yang A, Wang Y, Sun D, Park J, Sheets EE, Cviko A, Federschneider JM, Peters R, McKeon FD, Crum CP. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001;80: 24-9.
- [42] Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res* 2004;24: 771-5.
- [43] Martens JE, Smedts FM, Ploeger D, Helmerhorst TJ, Ramaekers FC, Arends JW, Hopman AH. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. *Int J Gynecol Pathol* 2009;28: 381-8.
- [44] Ye F, Zhou C, Cheng Q, Shen J, Chen H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2008;8: 108.
- [45] Liu WK, Jiang XY, Zhang ZX. Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol* 2010;155: 657-63.
- [46] Ye Y, Yin DT, Chen L, Zhou Q, Shen R, He G, Yan Q, Tong Z, Issekutz AC, Shapiro CL, Barsky SH, Lin H, Li JJ, Gao JX. Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. *PLoS One* 2010;5: e13406.
- [47] Ji J, Zheng PS. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum Pathol* 2010;41: 1438-47.
- [48] Cantz T, Key G, Bleidissel M, Gentile L, Han DW, Brenne A, Scholer HR. Absence of OCT4 expression in somatic tumor cell lines. *Stem Cells* 2008;26: 692-7.
- [49] Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z. The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Med Sci Monit* 2011;17: HY21-26.
- [50] Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, Alison MR, Miotti S. Tumor initiating cells: Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle* 2010;9: 1194-1206.
- [51] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51: 1417-23.
- [52] Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 2009;27: 2059-68.
- [53] Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133: 704-15.
- [54] Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3: e2888.
- [55] Li J, Zhou BP. Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer* 2011;11: 49.
- [56] Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 2009;22: 1129-34.
- [57] Gu W, Yeo E, McMillan N, Yu C. Silencing oncogene expression in cervical cancer stem-like cells inhibits their cell growth and self-renewal ability. *Cancer Gene Ther* 2011;18: 897-905
- [58] Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 2004;72: 387-95.
- [59] Terunuma A, Kapoor V, Yee C, Telford WG, Udey MC, Vogel JC. Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay. *Stem Cells* 2007;25: 664-9.

- [60] Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, Purushotham AD. Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 2008;122: 298-304.
- [61] Cioce M, Gherardi S, Viglietto G, Strano S, Blandino G, Muti P, Ciliberto G. Mammosphere-forming cells from breast cancer cell lines as a tool for the identification of CSC-like- and early progenitor-targeting drugs. *Cell Cycle* 2010;9: 2878-87.
- [62] Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008;121: 3683-92.
- [63] Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 2008;86: 1025-32.
- [64] Liu WK, Jiang XY, Zhang ZX. Expression of PSCA, PIWIL1, and TBX2 in endometrial adenocarcinoma. *Onkologie* 2010;33: 241-5.
- [65] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009;80: 1136-45.
- [66] Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008;135: 551-8.
- [67] Schuring AN, Schulte N, Kelsch R, Ropke A, Kiesel L, Gotte M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril* 2011;95: 423-6.
- [68] Gao Q, Geng L, Kvalheim G, Gaudernack G, Suo Z. Identification of cancer stem-like side population cells in ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Ultrastruct Pathol* 2009;33: 175-81.
- [69] Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 18700-5.
- [70] Dang D, Ramos DM. Identification of  $\alpha^6\beta^6$ -positive stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29: 2043-9.
- [71] Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, Swain JR, Wong MH. Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2010;139: 2072-2082 e5.
- [72] Guzman-Ramirez N, Voller M, Wetterwald A, Germann M, Cross NA, Rentsch CA, Schalken J, Thalmann GN, Cecchini MG. In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *Prostate* 2009;69: 1683-93.
- [73] Duhagon MA, Hurt EM, Sotelo-Silveira JR, Zhang X, Farrar WL. Genomic profiling of tumor initiating prostatespheres. *BMC Genomics* 2010;11: 324-340.
- [74] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007;58: 267-84.
- [75] Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW.  $\alpha(6)$  Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283: 668-73.
- [76] Fothergill T, McMillan NA. Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via  $\alpha$ -6  $\beta$ -4 integrin upon binding. *Virology* 2006;352: 319-28.
- [77] Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Mariani L, Syrjanen S, Favalli C, Syrjanen K. Relationship of up-regulation of 67-kd laminin receptor to grade of cervical intraepithelial neoplasia and to high-risk HPV types and prognosis in cervical cancer. *Acta Cytol* 2006;50: 6-15.
- [78] Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *Int J Cancer* 2009;124: 2060-70.
- [79] Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, Wu CP, Fostel JM, Mumau MD, Gottesman MM, Varticovski L, Ambudkar SV. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010;102: 1637-52.
- [80] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24<sup>(-low)</sup>/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006;98: 1777-85.

[81] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444: 756-60.

[82] Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, Rao M, de Souza-Pinto NC, Zeng X, Bohr VA. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008;26: 2266-74.

[83] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009;458: 780-3.



**ANEXOS**

**Anexo 1** – Grupos de genes seleccionados cuya expresión diferencial es superior a 1,5 o inferior a – 1,5 cambios de intensidad en células HeLa cultivadas en condiciones no adherentes.

**Genes asociados a células tumorigénicas**

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>CD44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	NM_000610.3	11.95
<i>ITGB1</i>	Integrina, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	NM_002211.3	5.29
<i>PSCA</i>	Prostate stem cell antigen	NM_005672.4	2.37
<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NM_002526.3	12.73
<i>PCGF4</i>	BMI1 polycomb ring finger oncogene	NM_005180.8	2.66
<i>ABCG2</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	NM_004827.2	3.02
<i>ALCAM</i>	Activated leukocyte cell adhesion molecule	NM_001627.2	3.17
<i>MET</i>	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	NM_001127500.1	2.94
<i>ITGA6</i>	Integrin, alpha 6	NM_001079818.1	3.79
<i>KRT15</i>	Keratin 15	NM_002275.3	2.40

**Genes asociados a la transición epitelio-mesenquimal**

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	NM_000602.3	2.43
<i>YBX1</i>	Y box binding protein 1	NM_004559.3	2.91
<i>ACTC1</i>	Actin, alpha, cardiac muscle 1	NM_005159.4	2.88

<i>SMAD2</i>	SMAD family member 2	NM_005901.4	2.59
<i>CTNNB1</i>	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	NM_001904.3	1.67
<i>DSP</i>	Desmoplakin	NM_004415.2	-2.25
<i>VIM</i>	Vimentin	NM_003380.3	3.99
<i>ITGA5</i>	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	NM_002205.2	2.92
<i>ITGAV</i>	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	NM_002210.3	1.96
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer-binding factor 1	NM_016269.4	1.76

#### Genes asociados a la unión de extremos no homólogos

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>XRCC6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	NM_001469.3	2.75
<i>XRCC5</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	NM_021141.3	2.67
<i>XRCC4</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	NM_003401.3	2.29
<i>XRCC2</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	NM_005431.1	2.11

#### Genes asociados al proceso de recombinación homóloga

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>RAD51L3</i>	RAD51-like 3	NM_002878.3	3.46
<i>RBBP8</i>	Retinoblastoma binding protein 8	NM_002894.2	2.82
<i>RAD54B</i>	RAD54 homolog B	NM_012415.3	2.57

### Genes asociados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>CYBA</i>	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	NM_000101.2	3.16
<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	NM_006793.2	3.66
<i>PRDX4</i>	Peroxiredoxin 4	NM_006406.1	2.27
<i>PRNP</i>	Prion protein	NM_000311.3	7.80
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2	NM_000636.2	3.16

**Anexo 2** – Grupos de genes seleccionados cuya expresión diferencial es superior a 1,5 o inferior a – 1,5 cambios de intensidad en células SiHa cultivadas en condiciones no adherentes

**Genes asociados a células tumorigénicas**

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>CD44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	NM_000610.3	3.31
<i>ITGB1</i>	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	NM_002211.3	3.61
<i>PSCA</i>	Prostate stem cell antigen	NM_005672.4	5.77
<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NM_002526.3	2.17
<i>ENG</i>	Endoglin	NM_001114753.1	2.44
<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	NM_002467.4	2.39
<i>ITGB6</i>	Integrin, beta 6	NM_000888.3	7.08
<i>MET</i>	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	NM_001127500.1	2.32
<i>ITGA6</i>	Integrin, alpha 6	NM_001079818.1	2.66
<i>KRT15</i>	Keratin 15	NM_002275.3	2.90

**Genes asociados a la transición epitelio-mesenquimal**

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	NM_000602.3	5.99
<i>YBX1</i>	Y box binding protein 1	NM_004559.3	4.58
<i>SMAD3</i>	SMAD family member 3	NM_005902.3	2.67

<i>ACTC1</i>	Actin, alpha, cardiac muscle 1	NM_005159.4	2.53
<i>SMAD2</i>	SMAD family member 2	NM_005901.4	2.28
<i>CTNNB1</i>	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	NM_001904.3	1.82
<i>CDH1</i>	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	NM_004360.3	-2.21
<i>TJP1</i>	Tight junction protein 1 (zona occludens 1)	NM_003257.3	-3.08
<i>DSP</i>	Desmoplakin	NM_004415.2	-5.04
<i>VIM</i>	Vimentin	NM_003380.3	

#### Genes asociados a la unión de extremos no homólogos

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>XRCC6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	NM_001469.3	5.24
<i>XRCC4</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	NM_003401.3	1.97

#### Genes asociados al proceso de recombinación homóloga

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>RAD51</i>	RAD51 homolog	NM_002875.4	2.52
<i>RAD21</i>	RAD21 homolog	NM_006265.2	2.35
<i>SHFM1</i>	Split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	NM_006304.1	2.39

### Genes asociados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de registro</b>	<b>Cambio en veces</b>
<i>CYBA</i>	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	NM_000101.2	2.67
<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	NM_006793.2	2.86
<i>PRDX4</i>	Peroxiredoxin 4	NM_006406.1	2.15
<i>PRNP</i>	Prion protein	NM_000311.3	4.63
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2	NM_000636.2	2.67

# Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance

Jacqueline López<sup>1</sup>, Adela Poitevin<sup>2</sup>, Veverly Mendoza-Martínez<sup>4</sup>, Carlos Pérez-Plasencia<sup>3</sup> and Alejandro García-Carrancá<sup>4\*</sup>

## Abstract

**Background:** Cancer-initiating cells (CICs) are proposed to be responsible for the generation of metastasis and resistance to therapy. Accumulating evidences indicates CICs are found among different human cancers and cell lines derived from them. Few studies address the characteristics of CICs in cervical cancer. We identify biological features of CICs from four of the best-know human cell lines from uterine cervix tumors. (HeLa, SiHa, Ca Ski, C-4 I).

**Methods:** Cells were cultured as spheres under stem-cell conditions. Flow cytometry was used to detect expression of CD34, CD49f and CD133 antigens and Hoechst 33342 staining to identify side population (SP). Magnetic and fluorescence-activated cell sorting was applied to enrich and purify populations used to evaluate tumorigenicity in nude mice. cDNA microarray analysis and in vitro radioresistance assay were carried out under standard conditions.

**Results:** CICs, enriched as spheroids, were capable to generate reproducible tumor phenotypes in nu-nu mice and serial propagation. Injection of  $1 \times 10^3$  dissociated spheroid cells induced tumors in the majority of animals, whereas injection of  $1 \times 10^5$  monolayer cells remained nontumorigenic. Sphere-derived CICs expressed CD49f surface marker. Gene profiling analysis of HeLa and SiHa spheroid cells showed up-regulation of CICs markers characteristic of the female reproductive system. Importantly, epithelial to mesenchymal (EMT) transition-associated markers were found highly expressed in spheroid cells. More importantly, gene expression analysis indicated that genes required for radioresistance were also up-regulated, including components of the double-strand break (DSB) DNA repair machinery and the metabolism of reactive oxygen species (ROS). Dose-dependent radiation assay indicated indeed that CICs-enriched populations exhibit an increased resistance to ionizing radiation (IR).

**Conclusions:** We characterized a self-renewing subpopulation of CICs found among four well known human cancer-derived cell lines (HeLa, SiHa, Ca Ski and C-4 I) and found that they express characteristic markers of stem cell, EMT and radioresistance. The fact that CICs demonstrated a higher degree of resistance to radiation than differentiated cells suggests that specific detection and targeting of CICs could be highly valuable for the therapy of tumors from the uterine cervix.

**Keywords:** Cancer-initiating cells, Cervical cancer, Stem cell markers, Radioresistance, Epithelia to mesenchymal transition

\* Correspondence: [carranca@biomedicas.unam.mx](mailto:carranca@biomedicas.unam.mx)

<sup>4</sup>Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud & Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

On the global scale, cervical cancer represents the second most frequent cancer in women with approximately 530,000 new cases registered each year and >274,000 deaths worldwide [1].

Currently, approximately 35% of women diagnosed with cervical cancer have recurrent disease, with 90% of these found within 3 years after the initial treatment [2]. Thus, improved targeted therapies and chemo-radiosensitization strategies are essential for reducing the mortality of this devastating malignancy.

One emerging model for the development of drug and radio-resistant invokes the existence within tumors of a pool of self-renewing malignant progenitors known as cancer-initiating cells (CICs), at the top of a hierarchy from which cells with distinct degrees of differentiation derive [3]. If CICs are more resistant to radiation, relapse after partial remission could likely be due to failure to eradicate these cells which, despite bulk tumor shrinkage can subsequently reproduce the entire malignant phenotype [4]. Indeed, normal stem cells have been shown to possess several characteristics that confer chemo- and radioresistance [4,5].

CICs were first identified in acute myeloid leukemia as possessing the cell surface antigenic phenotype CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> and the capacity to reproduce the complete leukemic hierarchy upon xenograftment [6,7]. Similar to the hematopoietic system, epithelial linings of the majority of tissue surfaces undergo continuous turnover and are organized according to a stem cell hierarchy [3]. In 2003, CD24<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> cells were isolated from human breast tumors that could be serially propagated in animals and could recapitulate their original phenotype [8]. CICs have since been identified from numerous other epithelial malignancies [9-12]. A consensus of five defining criteria has been established to affirm the existence of CICs: (a) capacity to self-renew; (b) tumorigenic potential to recreate the full phenotypic heterogeneity of the parent tumor; (c) expression of distinctive cells markers; (d) differentiation into nontumorigenic cells, and (e) restriction to a small minority of the total tumor population [3,13]. However, concerning this last feature the use of highly immunocompromised NOD/SCID interleukin-2 receptor gamma chain null mice, has shown that the detection of tumorigenic melanoma cells can be increased by several orders of magnitude [14].

In the case of cervical cancer, Feng et al. [15], isolated 8/19 tumor-derived cultures encompassing stem-like cells capable of self-renewal and extensive proliferation as clonal nonadherent spherical clusters. Xenograftment of  $1 \times 10^5$  dissociated spheroid cells allowed full recapitulation of the original tumor, whereas the same amount of non-selected tumor cells remained non-tumorigenic remained

non-tumorigenic. Furthermore, Sox2 staining was detected in the majority of tumor sphere cells isolated from fresh cervical cancer tissues but not from the differentiated cells. When Sox2 was stably expressed in cervical cancer cells (SiHa and HeLa), overexpressing cells had increased proliferation, clonogenicity, and tumorigenicity in vitro and in vivo [16].

Established cancer cell lines can be maintained indefinitely in culture and usually can form tumors when transplanted in vivo. Cancer cell lines are attractive and reproducible models for cancer studies and represent an alternative source for CICs research. However, studies with well-established cervical cell lines that allow a better understanding of CICs are still needed. The objective of this study was to isolate and characterize cervical CICs (CCICs) from four well-known established cell lines. These cells are fully capable of self renewing and of serially propagating tumors in nu-nu mice. CCICs-enriched spheroids fulfill currently accepted criteria for the existence of a subpopulation of CICs [3,13]. Gene profiling analysis showed increased expression of adult CICs markers, genes involved in DNA double-strand breaks (DSB) repair and genes involved in an epithelial to mesenchymal transition. Importantly, sphere-forming CCICs demonstrated a higher degree of radioresistance than differentiated cells suggesting that specific detection and targeting of CICs could be highly valuable for the therapy of recurrent chemo-radioresistant tumors of the uterine cervix.

## Methods

### Cell culture

HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-4 I human cervical cell lines were maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). In all experiments, cells were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% air atmosphere. All of our experiments were performed on cultures that were 70% confluent.

### Culture and passage of tumor spheres

Cells were placed in serum-free medium (SFM) mixed with 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Invitrogen), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Invitrogen), and 0.4% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) at a density of  $1 \times 10^3$  cells/ml and cultured in ultra low attachment plates (Costar). The sphere culture media was changed every 48 h until the majority of spheres reached 100-400 µm in diameter (approximately 7 days). Spheres were collected by gentle centrifugation (5 min at 2,500 rpm), dissociated with EDTA 1.0 mM, and mechanically disrupted with a fire-polished Pasteur pipette. The cell suspension was sieved through a cell

strainer with 40- $\mu$ m nylon mesh to achieve a single-cell suspension and then re-plated in complete fresh medium.

#### Sphere-forming efficiency assay

For analysis of sphere formation, subconfluent cells were thoroughly dissociated with EDTA to prepare a single-cell suspension that was always visually verified. Then, 100 cells per well were plated in 96-well culture dishes in 200  $\mu$ l of growth medium, and 25  $\mu$ l of medium per well was added every 2 days. The number of spheres for each well was evaluated 7 days after seeding and sphere formation rate was counted. Sphere-forming efficiency (SFE) was calculated as the number of spheres formed divided by the original number of single cells seeded and expressed as a percentage [17]. SFE was calculated from first through the fifth generation. All experiments were done in triplicate.

#### Differentiation assay

To examine cervical tumor-like epithelial differentiation of anchorage-independent cells, spheres were dissociated with EDTA and single cells were plated onto glass cover slips pre-coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) under standard conditions, DMEM/F12 supplemented with 10% FBS without growth factors. Cells were placed on cover slips, fed with FBS-supplemented medium every 2 days and processed 7 days after plating. Immunocytochemistry was performed with human anti-cytokeratin (AE1/3 clone, 1:50 final dilution, Dako) and visualized with LSAB + System-HRP (Dako). The chromogene was 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorate (Dako) solution developed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated and cleared in xylene, and then mounted with Eukitt medium.

#### Clonogenic assay

Each well (35-mm) of a six-well culture dish was coated with 2 ml bottom agar-medium mixture (DMEM, 10% FBS, 0.6% agar). After solidifying, 2 ml top agar-medium mixture (DMEM, 10% FBS, 0.3% Noble agar, BD Difco) containing cells was added, and dishes were incubated at 37°C for 21 days. Colonies were fixed with 6.0% glutaraldehyde, stained with 0.5% crystal violet, and counted using a dissecting microscope to determinate plating efficiency (PE).

#### Surface marker analysis by flow cytometry

One million cells were incubated for 10 min at 4°C with FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec), followed by labeling with monoclonal antibodies to CD34 (AC136 clone, 1:11 dilution, Miltenyi Biotec), CD49f (GoH3 clone, 1:11 dilution, Becton Dickinson) and CD133 (AC133/1 clone, 1:11 dilution, Miltenyi Biotec). After 15 min at 4°C, cells were extensively washed with ice-cold

PBS and resuspended in 0.5  $\mu$ g/ml propidium iodide (PI) for 10 min at room temperature, and shielded from light prior to flow cytometry analysis with FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) and Cell Quest Pro software (BD Biosciences, CA, USA). Fluorochrome-conjugated isotype-matched monoclonal antibodies from the same manufacturers were utilized to establish background fluorescence. CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells from umbilical cord blood were obtained from consenting mothers after full-term delivery and used as positive controls for CD133 and CD34 labeling. Human peripheral blood leukocytes were used as positive control for CD49f labeling.

#### Characterization of SP population

One millions of cells were resuspended in 1.0 ml of pre-warmed DMEM at 37°C containing 2% FBS, 1 mM Hepes, and 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and were incubated under constant and slow agitation for 90 mn at 37°C. When Verapamil was used to block Hoechst efflux, cells were stained as described in the presence of 50  $\mu$ M Verapamil (Sigma-Aldrich) [18]. After staining, cells were washed with Hank's buffered salt solution, resuspended in ice-cold staining media, and then maintained on ice until their analysis or sorting. Immediately before analysis, PI was added at a final concentration of 2 mg/ml. Bone marrow cells were used as positive control. Murine bone marrow was extracted from the femurs and tibias of C57B1/6 mice, a single-cell suspension was made by passage of the bone marrow through an 18-gauge needle, and the cells were pelleted by centrifugation. Analysis and sorting were performed with a MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter, CA, USA) employing 60-mW multiline ultraviolet (UV) from a coherent I-90 laser. Hoechst blue was detected at 424/24 nm and Hoechst red at 590/30. The channels were separated by a 555LP dichromic beam-splitter. Sorting was carried out using a 100-lm nozzle and at 35-W sheath pressure, utilizing the purity-1 mode. Dye effluxing cells appear as a low fluorescing population termed the side population (SP).

#### Isolation by magnetic (MCS) and fluorescence cell sorting (FCS)

Human cervical cells lines were magnetically labeled and separated by double passage with 1  $\mu$ l CD133 (CD133/1 clone, Miltenyi Biotec) and 1  $\mu$ l CD34 microbeads (QBEND/10 clone, Miltenyi Biotec) per  $1 \times 10^6$  cells, utilizing the Miltenyi Biotec CD34 and CD133 cell isolation kit. Indirect and positive separation was performed for CD49f using anti-phicoeritrin (PE) microbeads (PE4-14D10 clone, MiltenyiBiotec) and anti-CD49f-PE (GoH3 clone, Becton Dickinson). Magnetically enriched populations and SP were sorted with a MoFlo Cell Sorter

(Beckman Coulter, CA, USA). At least 5,000 events were acquired for each sample and cells positive for PI were gated out. After separation by MACS and/or FACS, aliquots of positive and negative sorted populations were evaluated for purity by flow cytometry with a FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) and Cell Quest software (BD Biosciences, CA, USA) using CD133/2-PE (239C3 clone, Miltenyi Biotec), CD49f (450-30A clone, Serotec), and CD34-PE antibodies (AC136 clone, Miltenyi Biotec). Purities ranged from 83 to 94% for positive and 89-99.7% for negative populations.

#### In vivo xenograft experiments

All animal experiments adhered to the requirements of NOM-062-ZOO-1999 Mexican Official Law and protocols were approved by the Ethics Committee of the Biomedical Research Institute, UNAM. Dissociated cells obtained under adherent and nonadherent conditions were counted and resuspended in 100  $\mu$ l of FBS and growth factor-free DMEM at different cell densities. Cells were injected subcutaneously (s.c.) into the left and right flanks of 4-6-week-old female nude athymic mice (BALB/c-nu/nu). Engrafted mice were inspected weekly for tumor appearance by visual observation and palpation. Six weeks after transplantation mice were euthanized and tumor tissue collected. Tumors were digested usually during 1 h using dispase solution (1 mg/ml, Invitrogen) and 0.5% collagenase Type I (Invitrogen). They were stirred slowly at 37°C until the tissue was completely dissolved. Dispersed cells were then separated from residual tissue by passing the mixture through a 40- $\mu$ m cell strainer to produce a single-cell suspension. Cells were obtained by centrifugation and plated in SFM. After reformation and dissociation of spheroids, single cells were reinjected into mice and, similar to the tumor mincing studies, the entire process was repeated. The remaining tumor, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin was sectioned (5- $\mu$ m) on a rotary microtome and subsequently stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological evaluation and immunohistochemistry. Immunostaining was performed using tissue sections mounted on poly-L-lysine-coated slides and dried at 37°C overnight. The slides were deparaffinized in xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min. To reduce nonspecific binding, the sections were incubated with 20% normal goat serum for 30 min at room temperature. Cells expressing human epithelial cytokeratins were identified after overnight incubation at 4°C with anti-cytokeratin AE1/3, as described above.

#### cDNA microarray analysis

Total RNA was extracted utilizing AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) and reverse-transcribed with the

MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Ambion) to generate Cy3- and Cy5-labeled (Ambion) cDNA probes for adherent and nonadherent samples, respectively. The labeled probes were hybridized to a cDNA Stanford University Microarray containing 40,000 immobilized oligonucleotide probes. Different fluorescently labeled cDNA probes were mixed in 45  $\mu$ l of hybridization buffer DIG Easy Hyb (Roche), applied to the microarray and incubated at 37°C for 16 h. After hybridization slides were washed with 0.1 X SSC/0.1% SDS, 0.1 X SSC and 0.01 X SSC for 5 min at room temperature. Fluorescence intensities of Cy3 and Cy5 targets were measured and scanned separately using the GenePix 4100A Array Scanner (Axon Instruments, CA, USA). Images and quantitative data of gene-expression levels were processed and analyzed by GenePix Pro V5.0 (Axon Instruments, CA, USA). The array data for expression of 12,500 genes were filtered and genes with a median expression increased or decreased by a factor of at least 1.5-fold were selected. A total of 638 genes in HeLa and 857 genes in SiHa were clustered by the use of Web-Gestalt (Gene Set Analysis Toolkit). Two independent experiments were performed.

#### Radioresistance assay

Cells from both monolayer cultures and 7-day-old spheres were enzymatically dissociated with EDTA and mechanically dissociated with a Pasteur pipette, both passed through a 40- $\mu$ m sieve and immediately irradiated as single-cell DMEM suspension at a dose rate of 240 cGy/min for the time required to generate dose curves of 2, 4, 6, 8, and 10Gy with a linear accelerator Clinac 2100C, (Varian Medical Systems, CA, USA), operating at 6 MV. Corresponding controls were sham-irradiated. Colony-forming assays were performed immediately after irradiation by plating cells into triplicate six-well culture dishes. After 21 days, colonies were fixed with 6.0% glutaraldehyde, stained with 0.5% crystal violet, and counted. To generate a radiation survival curve, the surviving fraction (SF) at each radiation dose was normalized to that of the sham-irradiated control, and curves were fitted using a linear-quadratic model,  $SF = \exp(-ad - bd^2)$  in which *a* is the number of logs of cells killed per gray from the linear portion of the survival curve, and *b* is the number of logs of cells killed per gray<sup>2</sup> from the quadratic component. Three independent experiments were performed.

#### Statistical analysis

The approximation of data distribution to normality was preliminarily tested. Results are presented as mean and differences of the means with standard deviations (SDs) or 95% confidence intervals (CI). Statistical analysis was performed using factorial design analysis of variance

(ANOVA) and Student two-tailed and unpaired *t* tests as appropriate utilizing Minitab 15™ software. Statistical significance when  $p < 0.05$ .

## Results

A subpopulation of cells with self-renewing and sphere-formation capacity is found among different cell lines established from tumors of the uterine cervix. Cells from four well-known cell lines derived from either squamous carcinomas (SiHa, Ca Ski, and C-4 I) or adenocarcinomas (HeLa) of the uterine cervix were cultured at low density (1,000 cells/ml) as suspension in serum-free sphere medium. Six days after plating, nonadherent spherical clusters of cells were observable with different morphologic phenotypes (Figure 1a) similar to spheroids isolated from human primary tumor tissues and cell lines [15,16,19]. All spheroids increased progressively in diameter (Figure 1b). Sphere formation efficiency (SFE) in the first generation was  $7.8 \pm 0.69\%$  (mean  $\pm$  SD;  $n = 10$  independent experiments) for HeLa,  $6.8 \pm 0.57\%$  for SiHa,  $4.7 \pm 0.34\%$  for Ca Ski, and  $4.4 \pm 0.54\%$  for C-4 I, respectively (Figure 1c). After 7 days in culture primary cervospheres were collected by gentle centrifugation, dissociated, sieved, and re-plated at low density in order to give rise to secondary spheres. SFE was found to be higher in the second generation indicating an increased capacity for sphere formation from passages 1 to 2. Although this enhanced capacity does not persist for several passages spheres could be serially passaged for up to 10 generations and approximately 1-5% of them remained as larger, symmetric, prototypical spheroids providing a definitive evidence for the presence of extended self-renewal. Additionally, when single cells from spheroids were cultured during 7 days under standard differentiating conditions, floating cells could adhere, acquire an epithelial morphology, form symmetric colonies, and survive subsequent passages. As expected, when we examined spheroid-derived cells for CD49f and CD133 CICs markers under differentiating conditions, expression was lost or greatly reduced after 7 days to minimal expression values similar to monolayer cells. Finally, to further support possible differentiation of cell derived from spheres, expression of epithelial differentiation markers was examined demonstrating positivity for cytokeratin AE1/3 in all differentiated spheroids (data not shown). Taken together these data indicate that a subpopulation of cells from spheroids self-renew and differentiate assuming an epithelial tumor phenotype. In addition, to determine whether cells from spheroids possess proliferative potential, we determined their clonogenicity in vitro. Cells from spheroids plated at low densities under anchorage-independent conditions showed significantly higher colony-forming abilities compared with their monolayer counterparts. Cells from HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-4 I spheroids gave rise to a 1.9-, 1.5-, 2.0- and

2.4-fold greater number of colonies than those from monolayers, respectively. Cells from SiHa spheroids exhibited higher plating efficiency (PE) values ( $0.95 \pm 0.09\%$ ) than HeLa ( $0.81 \pm 0.06\%$ ), C-4 I ( $0.44 \pm 0.08\%$ ), and Ca Ski ( $0.42 \pm 0.07\%$ ) (mean  $\pm$  SD;  $n =$  three independent experiments), and these numbers were significantly greater than those obtained from monolayer cells ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ), (Additional file 1: Figure S1, available online). These results are consistent with the possibility that cervospheres might be enriched in CCICs.

### Sphere-forming cells express CD49f

Previous studies showed expression of CD34 as a hematopoietic stem cells marker [6,7], so tested it as the blood and urogenital systems share the same embryonic origin. CD49f has been used as epithelial stem marker in human epidermis [20,21] CD133 is one of the most widely used markers to identify CICs, including epithelial tissues [22]. We performed an initial screen with CD44 and CD71 and found preliminary in vivo tumorigenicity assays showed that these populations were not able to generate tumors. We determine whether cultured epithelial cells grown as spheroids are enriched for cells expressing these stem-cell markers. The vast majority of cells stained positive for CD49f, only a minority of them were positive for CD133, while they all showed negative for CD34. Specifically, CD49f-positive cells were  $91.67 \pm 2.31\%$ ,  $98.77 \pm 3.47\%$ ,  $92.33 \pm 8.39\%$ , and  $96.72 \pm 4.09\%$  (mean  $\pm$  SD;  $n =$  three independent experiments) for HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-4 I spheroids cells, respectively. CD133-positive cells were  $14.67 \pm 4.73\%$ ,  $9.28 \pm 3.15\%$ ,  $18.36 \pm 0.16\%$ , and  $61.45 \pm 2.26\%$  (mean  $\pm$  SD;  $n =$  three independent experiments) for HeLa, SiHa, Ca Ski and C-4 I cells in spheroids. It has been previously shown that sphere-forming cells isolated from primary carcinoma of the cervix uteri [15] and samples from human endometrium [23-25] are negative for CD34. Immunanalysis of cells growing under adherent or differentiating conditions by flow cytometry demonstrated low frequency levels of these markers,  $<2\%$  in all cases except for CD49f in SiHa ( $13.68 \pm 2.79\%$ , mean  $\pm$  SD;  $n =$  three independent experiments) (Figure 2). These results suggest that sphere-forming CCICs, under stem cell-selective conditions, are enriched for CD49f compared with cervical cell lines and CCICs under differentiating conditions.

### Cervical cancer cell lines harbor Hoechst effluxing cells

Many stem cells are endowed with the ability to efflux certain lipophilic drugs due to their cell surface expression of ABC family members of membrane transporter proteins and are denominated side population (SP) [18]. When we attempted to explore the existence of a SP within these cancer cell lines, we found that  $1.1 \pm 0.19\%$  of HeLa (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$  independent experiments)

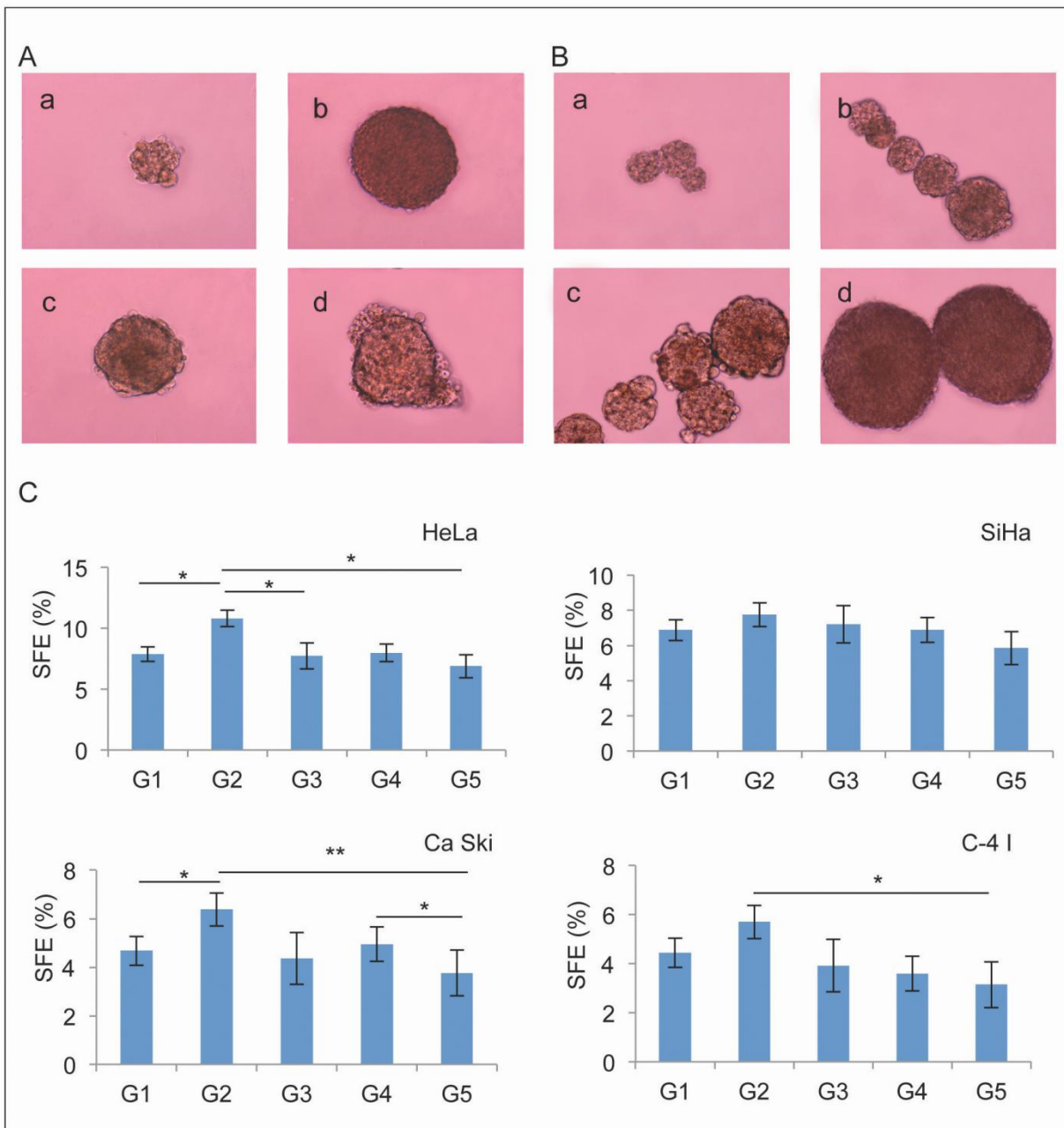


Figure 1 Spheroids of self-renewing cells from established human cell lines of squamous carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. A, Morphology of cells cultured in anchorage-independent conditions as non-adherent clusters one week after plating HeLa (a), SiHa (b), Ca Ski (c), and C-4 I (d) cells. Magnification is 10X, size bar = 100  $\mu$ m. B, Serial photographs during culture demonstrated progressive increase in diameter at 4 (a), 8 (b), 12 (c) and 16 days (d). Magnification is 10X, size bar = 100  $\mu$ m. C, Sphere-forming efficiency (SFE) of spheroid cells on serial passage from first to fifth generation (G1-G5). Cells were plated at a density of 100 cells/well in 200- $\mu$ l of serum-free medium (SFM), spheres were counted weekly. Bar graph represents the SFE mean calculated by counting the number of spheres formed in a given well and dividing by the total number of cells seeded in the well, represented as a percentage. Error bars represent standard deviation (SD) (n = 3); \* p < 0.05 and \*\* p < 0.005

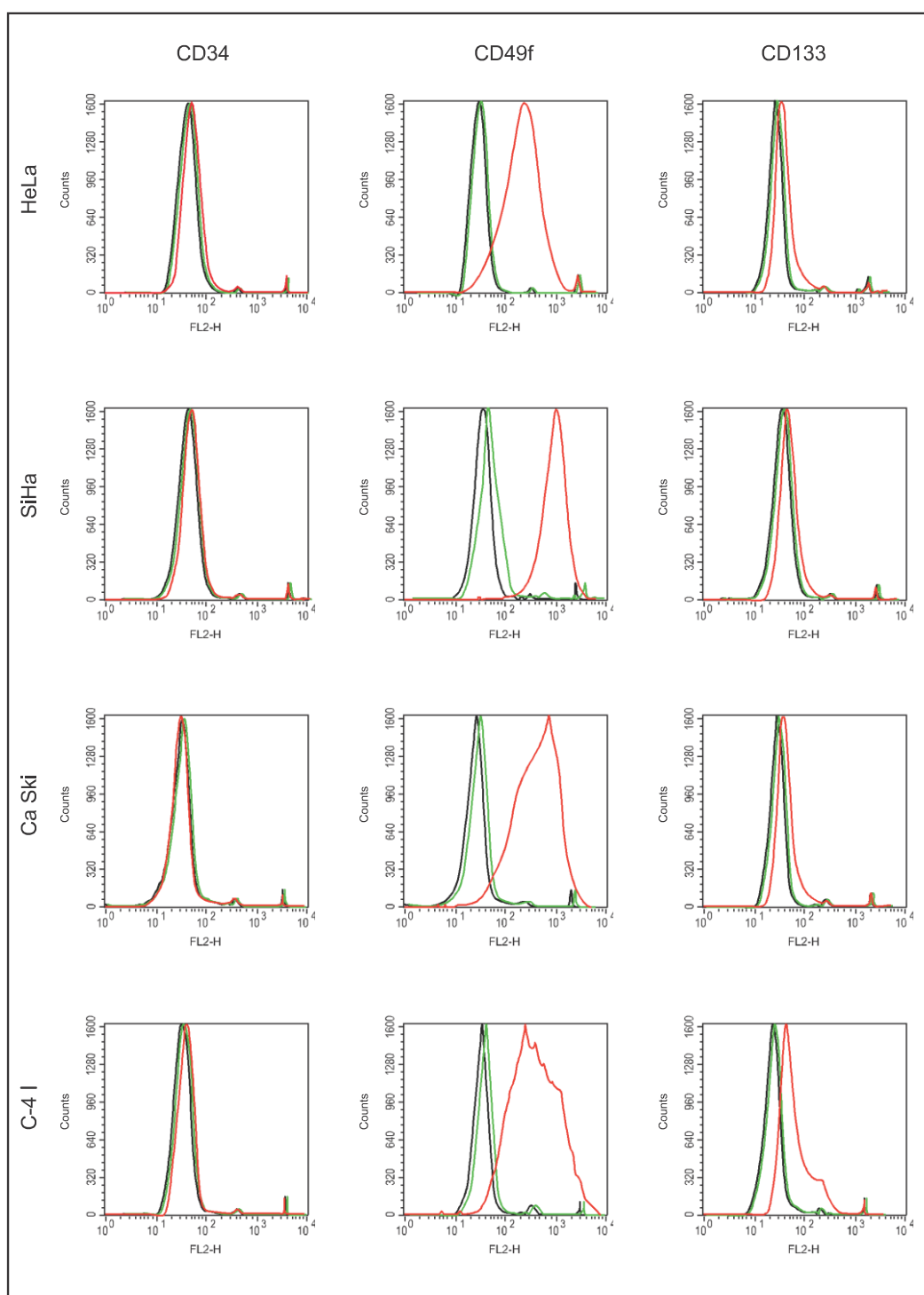


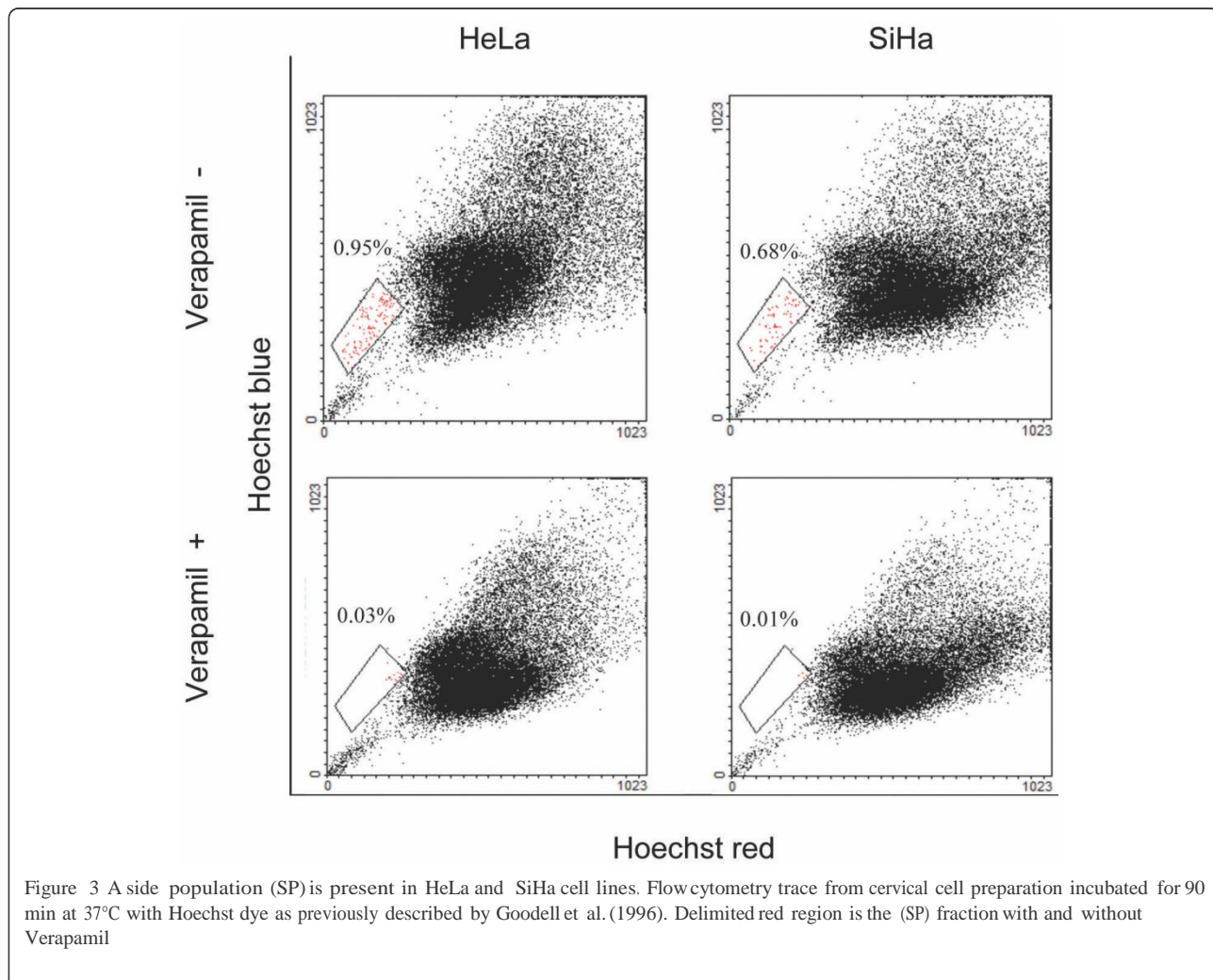
Figure 2 Immune phenotype analysis of cervical tumor sphere-forming cells. Sphere-forming cells and monolayer cells were stained with CD34, CD49f, and CD133 conjugated primary antibodies and subjected to flow cytometry. Red line corresponds to sphere-forming cells, green line to monolayer cells, and black line to isotype control

and  $0.7 \pm 0.08\%$  of SiHa cells showed a distinct SP phenotype (Figure 3), confirming that established cell lines from the uterine cervix contain at least two phenotypically distinct sub-populations, one of which bears stem-cell features.

Sphere-forming cells are more tumorigenic than those grown as monolayer

To investigate the ability of different cell populations to generate tumors, we examined the efficiency of monolayer, sphere-forming, SP, CD34, CD133, and CD49f cells to form tumors in athymic mice, as previously shown for other epithelial CICs [9-12]. SP-positive HeLa cells formed one tumor per two injections with  $1 \times 10^4$  cells and CD34 and CD133 positive cells remained nontumorigenic in both cell lines. Injection of  $1 \times 10^3$  CD49f<sup>+</sup> cells were tumorigenic in 1/6 and 2/6 nude mice, in HeLa and SiHa, respectively. Injections of  $1 \times 10^3$  HeLa and SiHa spheroid-derived cells were slightly more tumorigenic in athymic nude mice than CD49f

positive cells.  $1 \times 10^4$  Ca Ski and C-4 I dissociated spheroid cells allowed formation of tumors, whereas injection of  $1 \times 10^6$  cells growth as monolayer remained nontumorigenic (Table 1). HeLa and SiHa cells under adherent conditions were able to produce tumors when at least  $5 \times 10^5$  cells were injected, but failed to do so with Ca Ski and C-4 I, albeit with extended latency (10 weeks). Tumors generated with cells from spheroids showed a progressive increase in weight in parallel with the number of injected cells (data not shown). All tumors were readily apparent by visual inspection and palpation, except for a tumor formed with  $1 \times 10^4$  SP<sup>+</sup> cells, which was detected only upon necropsy. Tumors obtained with cell from spheroids were categorized as poorly differentiated carcinomas (grade 1/grade 2), with histologic features similar to those of the corresponding tumors generated with cell grown as monolayers, including expression of human cytokeratin AE1/3. One essential criterion for CICs is their ability to propagate tumors serially in consecutively engrafted animals.



**Table 1** In vivo tumorigenicity of cervical cancer-initiating cells

Subpopulation	Cells	Tumors/injections			
		HeLa	SiHa	Ca Ski	C-4 I
Spheroid cells	$1 \times 10^3$	2/6	3/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^4$	4/6	4/6	3/6	2/6
	$1 \times 10^5$	5/6	4/6	4/6	4/6
	$1 \times 10^5$	0/6	0/6	0/6	0/6
	$5 \times 10^5$	1/6	1/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^6$	5/6	2/6	0/6	0/6

Tumor formation ability of spheroids. Cells were grown in serum-free medium (SFM) as nonadherent cervospheres and assayed for the ability to form tumors after s.c. injection on nu-nu mice at  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ , and  $1 \times 10^5$  cells per injection. At the same time, adherent cells were assayed at  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ , and  $1 \times 10^6$  cells per injection. The number of tumors that formed and the number of injections performed are indicated for each condition

To examine this, serial engraftments of HeLa tumors obtained with cells derived from spheroids were performed by s.c. transplantation of 1-mm tumor pieces into nude mice. Generally, tumors developed 4 weeks after transplantation with a total of four such successful serial transplantations. Secondly, dissociated cells from HeLa tumors obtained with spheroids could reform spheroids under stem cell-selective conditions. Reinjection (s.c.) of  $1 \times 10^4$  cells from such secondary sphere-forming cells resulted in tumors with latency that was slightly shorter than that of the parental sphere-forming cells. These results indicate that sphere-forming cells are more malignant than their parental tumor cells, demonstrating that a highly tumorigenic subpopulation of cells resides within cervical cell lines.

Spheroid-derived cells exhibit up-regulated expression of CICs genes

After demonstration of the ability of tumor-derived cells to organize self-renewing spheroids that possess higher tumorigenic capacity, CICs-specific gene expression was examined. RNA from spheroid or monolayer cells was analyzed by profiling expression with a cDNA microarray. As a result, analysis showed that 767 and 547 genes exhibit a >1.5-fold different expression between HeLa and SiHa cells grown as spheroids versus monolayers, respectively. Stem-cell markers of adult female reproductive system that were up-regulated in cervical spheroids included CD44 [15,23,26-28], ITGB1 (CD29) [23,24], PSCA [29], NT5E (CD73) [23-25], ENG (CD105) [23,25], MYC (c-Myc) [15], PCGF4 (BMI-1) [28,30], and ABCG2 [28,31-33]. Other epithelial CICs markers found included ITGB6 [34], ALCAM (CD166) [10,35], MET (c-Met) [36], and KRT15 [37] (Figure 4a). We were highly interested and indeed found changes in expression of members of other gene groups such as epithelial to mesenchymal transition (EMT)-associated genes (SERPINE1, YBX1, SMAD3, ACTC1, SMAD2, CTNBN1,

CDH1, TJP1, DSP, VIM, ITGA5, ITGAV, and LEF1, Figure 4b); DNA repair double-strand breaks (DSBs) genes (XRCC6, XRCC5, XRCC4, and XRCC2, non-homologous end-joining genes (NHEJ), and RAD51, RAD51L3, RBBP8, RAD21, RAD54B, and SHFM1, homologous recombination genes (HR), Figures 5a and 5b) and genes involved in reactive oxygen species (ROS), metabolism (CYBA, PRDX3, PRDX4, PRNP, and SOD2, Figure 5c). Additional files show description of genes in more detail (Additional files 2,3,4,5,6,&7: Tables S1-S6 and Additional file 8: Figure S2, available online).

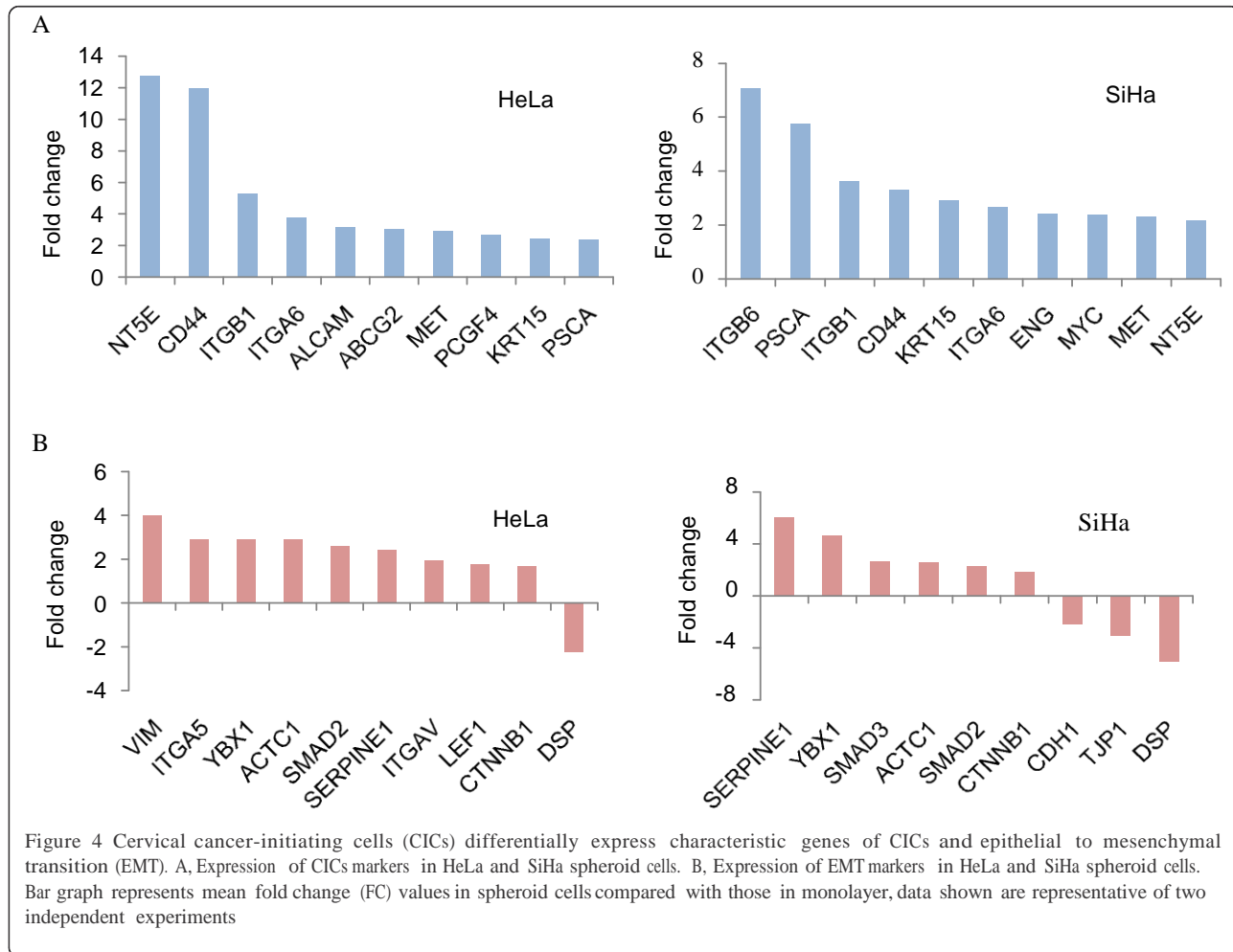
CCICs-enriched spheroids possess a higher degree of radioresistance than monolayer culture-derived cells

To examine whether self-renewing cells from spheroids (exhibiting higher expression of DNA repair and ROS metabolism genes) possess a radioresistant phenotype, we assessed the sensitivity of cervical cell lines to increasing x-ray treatment (up to 10 Gy) under stem cell-selective vs. differentiating conditions. As expected, cervospheres and monolayer cells showed a progressive decrease in survival with an increasing dose of radiation. As shown in Figure 5d, after IR treatment, the SF of the CCICs-enriched population was significantly higher than that of cells grown as monolayer (HeLa monolayer-derived cells, mean SF at 2 Gy ( $SF_{2Gy}$ ) =  $0.42 \pm 0.06$  vs. spheroid cells  $SF_{2Gy}$  =  $0.60 \pm 0.11$ ,  $p = 0.05$ ; SiHa monolayer-derived cells,  $SF_{2Gy}$  =  $0.56 \pm 0.10$  vs. spheroid cells  $SF_{2Gy}$  =  $0.65 \pm 0.09$ ,  $p < 0.001$ ; Ca Ski monolayer-derived cells,  $SF_{2Gy}$  =  $0.59 \pm 0.04$  vs. spheroid cells  $SF_{2Gy}$  =  $0.76 \pm 0.06$ ,  $p = 0.02$ ; C-4 I monolayer-derived cells,  $SF_{2Gy}$  =  $0.39 \pm 0.05$  vs. spheroid cells  $SF_{2Gy}$  =  $0.53 \pm 0.02$ ,  $p = 0.02$ ;  $n = 3$ , two-sided Student t test (Table 2). These results support a role for these CICs in cervical cancer radioresistance.

## Discussion

In this report we describe the isolation and characterization of a highly tumorigenic subpopulation of cells from cultures of HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-4 I cells that exhibits characteristics of CICs. Previous characterization of CICs from cervical tumor-derived cultures encompassing stem-like cells capable of self-renewal and extensive proliferation was described by Feng et al. [15]. To our knowledge, this is the first characterization of such cells from some of the best-know human cancer cell lines derived from uterine cervix tumors. According to the five separate criteria that have been established to identify candidate CICs [3,13], we found a subpopulation restricted to a small minority of the total cells with self-renewing capacity in vitro and in vivo (criteria a and b). This subpopulation of sphere-forming cells was more tumorigenic than unselected parental tumor cells and resulted in graft tumors that were histologically identical



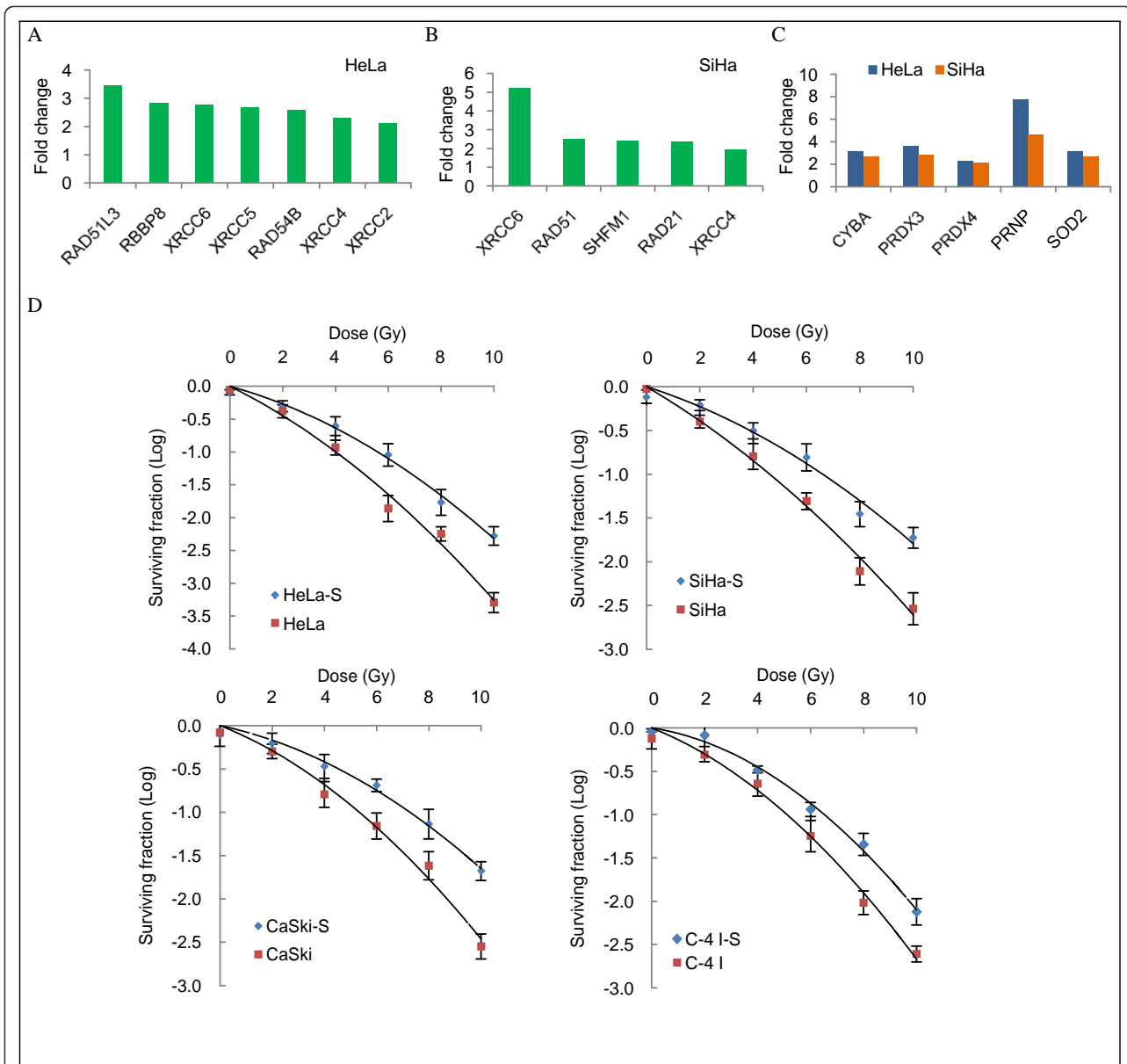


to the tumors generated from cell lines without selection (criterion c). Differentiation into nontumorigenic cells was evidenced by H&E and cytokeratin staining (criterion d), and cultured spheroid cells exhibited a distinctive cell surface phenotype, CD49f (criterion e). Interestingly, CD49f (ITGA6), an alpha-6 integrin, has been postulated as the primary receptor protein in natural human papillomavirus (HPV) infection [38-40]; thus, we postulate that adult reserve cells with expression of CD49f could be preferentially targeted by high-risk HPV types during cervical carcinogenesis.

In addition to CICs markers of the adult female reproductive system, many EMT-associated markers were also found up-regulated in CCICs-enriched spheroids. Recently, it has been reported that induction of EMT in differentiated immortalized human mammary epithelial cells led to the acquisition of the CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> stem-cell phenotype [41]. In HeLa, tumorsphere formation and expression of CD44 were significantly elevated when Twist, a key transcriptional factor of EMT, was overexpressed [42]. Our

spheroid cells also gained expression of human ACTC1 (αSMA) and VIM (Vimentin) mesenchymal markers, similar to ovarian cancer cell-formed spheroids [43], and doxorubicin-selected MCF-7/ADR cells [44] indicating that an EMT had occurred during cancer progression of the CICs [45].

Other characteristic of CICs in solid tumors is their radiation resistance, evidenced in breast cancer [46] and glioma tumors [47]. Our functional assay showed that sphere-forming CCICs possess a higher degree of resistance to IR than monolayer cells. We observed increased clonogenic survival for human CCICs-enriched population in which the HR and NHEJ repair pathways and some growth arrest and DNA damage-inducible genes, such as GADD45A and PPP1R15A, were hyperstimulated, similar to the reported expression of DNA repair-DSBs genes in human embryonic stem cells [48]. Furthermore, Diehn et al. [49], found that expression of genes involved in ROS metabolism, such as CYBA, SOD2, and PRNP, was highly overrepresented in breast CICs-enriched



**Figure 5** Cervical cancer-initiating cells (CCICs) are more resistant to X-ray treatment. **A**, DNA repair double-strand breaks (DSB) genes differentially expressed in HeLa CCICs. **B**, as in **A** but SiHa CCICs. **C**, Reactive oxygen species (ROS) metabolism genes overrepresented in HeLa and SiHa CCICs-enriched spheroids compared with monolayer counterparts. **D**, Cell survival curves for CCICs-enriched spheroid and monolayer cells. For x-ray treatment, cells were dissociated and irradiated in suspension with 0, 2, 4, 6, 8, and 10 Gy with a linear accelerator Clinac 2100C operating at 200 cGy/min and 6MV. Cells were then seeded in six-well dishes at an appropriate number with DMEM and noble agar (0.3%) for clonogenic survival assay. Twenty one days after irradiation colonies were fixed and stained. Colonies comprising >50 cells were counted for each dose point. To determine surviving fractions (SFs) counts were normalized using the plating efficiency (PE) of the unirradiated corresponding control. Error bars represent standard deviation (SD). Data shown are representative of three independent experiments; S: CCICs-enriched spheroid cells

population. These important antioxidant genes were also enriched in our spheroid cells. Taken together, these findings are consistent with the hypothesis that enhanced expression of ROS defenses and up-regulation of EMT-associated genes [50] in CCICs contributes to enhanced cell survival and acquisition of radioresistance.

### Conclusions

We have enriched and characterized a self-renewing subpopulation of CCICs among four well known human cancer-derived cell lines (HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-4 I), established from squamous carcinomas and adenocarcinomas of the uterine cervix. CCICs were enriched as

Table 2 SF<sub>2</sub>, a and b values in spheres and their monolayer counterparts from established cervical cell lines

Cell line	a (Gy <sup>-1</sup> )		b (Gy <sup>-2</sup> )		SF <sub>2</sub>	
	Monolayer	Sphere	Monolayer	Sphere	Monolayer	Sphere
HeLa	0.166 ± 0.044	0.082 ± 0.017	0.011 ±	0.013 ± 0.007	0.42 ± 0.06	0.60 ± 0.11
SiHa	0.099 ± 0.021	0.070 ± 0.011	0.013 ±	0.016 ± 0.005	0.56 ± 0.10	0.65 ± 0.09
Ca Ski	0.087 ± 0.032	0.032 ± 0.007	0.012 ±	0.013 ± 0.008	0.59 ± 0.04	0.76 ± 0.06
C-41	0.151 ± 0.075	0.115 ± 0.029	0.009 ±	0.011 ± 0.005	0.39 ± 0.05	0.53 ± 0.02

Parameters of cell survival curves were calculated using a linear-quadratic model for surviving fraction, SF = exp (-ad - bd<sup>2</sup>). a: number of logs of cells killed per gray from the linear portion of the survival curve; b: number of logs of cells killed per gray<sup>2</sup> from the quadratic component. Three independent experiments were performed.

spheroids in selective medium with defined factors and found capable of generation of reproducible tumor phenotypes in nu-nu mice and serial propagation. Injection of 1 × 10<sup>3</sup> dissociated spheroid cells allowed formation of tumors in the majority of animals, whereas injection of 1 × 10<sup>5</sup> monolayer cells remained nontumorigenic for all cell lines. Sphere-forming CICs expressed CD49f surface marker. When gene profiling analysis of HeLa and SiHa was performed, up-regulation of CICs markers characteristic of the female reproductive system and EMT transition-associated markers was observed. More importantly, this analysis indicated that radioresistance genes were also up-regulated, including components of the DSB-DNA repair machinery and the metabolism of ROS. CICs-enriched populations indeed exhibited an increased resistance to IR. This could be important for addressing and understanding the possible implication of CICs in cancer treatment.

### Additional material

Additional file 1: Figure S1. Plating efficiency for monolayer- and spheroids-derived cells.

Additional file 2: Table S1- Genes. Selected group of genes whose expression was found up-or down-regulated by a factor of at least 1.5-fold in HeLa spheroid cells compared with HeLa monolayer cells.

Additional file 3: Table S2- Genes. Selected group of genes whose expression was found up-or down-regulated by a factor of at least 1.5-fold in SiHa spheroid cells compared with SiHa monolayer cells.

Additional file 4: Table S3- Genes. Biological functions of the genes with altered up-regulated expression by a factor of at least 1.5-fold in HeLa spheroid cells compared with HeLa monolayer cells, as determined by WebGestalt (Gene Set Analysis Toolkit).

Additional file 5: Table S4- Genes. Biological functions of the genes with altered down-regulated expression by a factor of at least 1.5-fold in HeLa spheroid cells compared with HeLa monolayer cells, as determined by WebGestalt (Gene Set Analysis Toolkit).

Additional file 6: Table S5- Genes. Biological functions of the genes with altered up-regulated expression by a factor of at least 1.5-fold in SiHa spheroid cells compared with SiHa monolayer cells, as determined by WebGestalt (Gene Set Analysis Toolkit).

Additional file 7: Table S6- Genes. Biological functions of the genes with altered down-regulated expression by a factor of at least 1.5-fold in SiHa spheroid cells compared with SiHa monolayer cells, as determined by WebGestalt (Gene Set Analysis Toolkit).

Additional file 8: Figure S2- Genes. Vein diagram for common genes between HeLa and SiHa spheroid cells compared with monolayer cells.

whose expression was found up- and down-regulated by a factor of at least 1.5-fold.

### Abbreviations

bFGF: Basic fibroblast growth factor; BSA: Bovine serum albumin; CCICs: Cervical cancer-initiating cells; CICs: Cancer-initiating cells; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; DSBs: Double-strand breaks; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; EGF: Epidermal growth factor; EMT: Epithelial to mesenchymal transition; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; FBS: Fetal bovine serum; H&E: Hematoxylin and eosin; HPV: Human papillomavirus; HR: Homologous recombination mechanism; IR: Ionizing radiation; MACS: Magnetic-activated cell sorting; NHEJ: Non-homologous end joining mechanism; PE: Phicoeritrin; PE: Plating efficiency; PI: Propidium iodide; ROS: Reactive oxygen species; s.c.: Subcutaneous; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SF: Surviving fraction; SFE: Sphere forming-efficiency; SFM: Serum-free medium; SP: Side population; SSC: Saline-sodium citrate.

### Acknowledgements

We acknowledge generous grant support from Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICyT-GDF; GI/PIFUTP08-142 to AG-C), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACYT-México grants 44071 and 127822 to AG-C), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM; IN226408 to AG-C), and Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud. We like to thank Héctor Mayani, Ph.D., Iván Velasco, Ph.D., Alejandro Zentella, Ph.D., Víctor Rosales, M. Sc., Gabriel Resendiz, M.Sc., Emma Marsal, MD. for helpful suggestions and Raquel López Paniagua for extraordinary support.

### Author details

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup>Hospital Médica Sur, Unidad de Radioterapia, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Laboratorio de Oncología Genómica, Instituto Nacional de Cancerología & UBIMED-FESI, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>4</sup>Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud & Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

### Authors' contributions

JL participated in the acquisition, analysis and interpretation of all data. VMM and CPP conducted cDNA microarray assays and preliminary analysis. AP conducted the radioresistance assay. JL and AGC designed the study and prepared the manuscript. AGC conceived the study and coordinated it. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 27 June 2011 Accepted: 28 January 2012

Published: 28 January 2012

## References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127(12):2893-2917.
2. Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E: Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat Rev* 2008, 34(7):603-613.
3. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF: Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007, 58:267-284.
4. Dean M, Fojo T, Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(4):275-284.
5. Wicha MS, Liu S, Dontu G: Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer research* 2006, 66(4):1883-1890, discussion 1895-1886.
6. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994, 367(6464):645-648.
7. Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997, 3(7):730-737.
8. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(7):3983-3988.
9. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ: Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 2005, 65(23):10946-10951.
10. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, et al: Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(24):10158-10163.
11. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research* 2005, 65(20):9328-9337.
12. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 2007, 67(3):1030-1037.
13. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 2006, 66(19):9339-9344.
14. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ: Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008, 456(7222):593-598.
15. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z: Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 2009, 22(5):1129-1134.
16. Ji J, Zheng PS: Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum Pathol* 2010, 41(10):1438-1447.
17. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG: Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research* 2005, 65(13):5506-5511.
18. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996, 183(4):1797-1806.
19. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, Alison MR, Miotti S: Tumor initiating cells: development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle* 2010, 9(6):1194-1206.
20. Webb A, Li A, Kaur P: Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation; research in biological diversity* 2004, 72(8):387-395.
21. Terunuma A, Kapoor V, Yee C, Telford WG, Udey MC, Vogel JC: Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007, 25(3):664-669.
22. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007, 445(7123):106-110.
23. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D: Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009, 80(6):1136-1145.
24. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S: Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008, 135(4):551-558.
25. Schuring AN, Schulte N, Kelsch R, Ropke A, Kiesel L, Gotte M: Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril* 2011, 95(1):423-426.
26. Alvero AB, Chen R, Fu HH, Montagna M, Schwartz PE, Rutherford T, Silasi DA, Steffensen KD, Waldstrom M, Visintin I, et al: Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* 2009, 8(1):158-166.
27. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, Eramo A, Napolitano C, Gallo D, Perillo A, et al: Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2009, 15(13):4299-4311.
28. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP: Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research* 2008, 68(11):4311-4320.
29. Liu WK, Jiang XY, Zhang ZX: Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol* 2010, 155(5):657-663.
30. Hubbard SA, Friel AM, Kumar B, Zhang L, Rueda BR, Gargett CE: Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer research* 2009, 69(21):8241-8248.
31. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, MacLaughlin DT, Donahoe PK: Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103(30):11154-11159.
32. Gao Q, Geng L, Kvalheim G, Gaudernack G, Suo Z: Identification of cancer stem-like side population cells in ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Ultrastruct Pathol* 2009, 33(4):175-181.
33. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, et al: Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(47):18700-18705.
34. Dang D, Ramos DM: Identification of alpha v beta 6-positive stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009, 29(6):2043-2049.
35. Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, Swain JR, Wong MH: Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2010, 139(6):2072-2082, e2075.
36. Guzman-Ramirez N, Voller M, Wetterwald A, Germann M, Cross NA, Rentsch CA, Schalken J, Thalmann GN, Cecchini MG: In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *Prostate* 2009, 69(15):1683-1693.
37. Duhagon MA, Hurt EM, Sotelo-Silveira JR, Zhang X, Farrar WL: Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres. *BMC Genomics* 2010, 11:324-340.
38. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW: alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 283(3):668-673.
39. Fothergill T, McMillan NA: Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology* 2006, 352(2):319-328.
40. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, et al: Relationship of up-regulation of 67-kd laminin receptor to grade of cervical intraepithelial neoplasia and to high-risk HPV types and prognosis in cervical cancer. *Acta Cytol* 2006, 50(1):6-15.
41. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133(4):704-715.
42. Li J, Zhou BP: Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer* 2011, 11(1):49.

43. Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ: Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *Int J Cancer* 2009, 124(9):2060-2070.
44. Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, Wu CP, Fostel JM, Mumau MD, Gottesman MM, Varticovski L, Ambudkar SV: Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010, 102(21):1637-1652.
45. Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y, Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Kato K, et al: Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. *Am J Pathol* 2010, 176(1):381-392.
46. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F: The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98(24):1777-1785.
47. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, 444(7120):756-760.
48. Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, Rao M, de Souza-Pinto NC, Zeng X, Bohr VA: Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008, 26(9):2266-2274.
49. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, et al: Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009, 458(7239):780-783.
50. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA: Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009, 27(9):2059-2068.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/48/prepub>

doi:10.1186/1471-2407-12-48

Cite this article as: López et al: Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 2012 12:48.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

