



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS  
MARCADORES DE PLURIPOTENCIA OCT-4, SOX-2  
Y NANOG EN LÍNEAS CELULARES Y BIOPSIAS  
ASOCIADAS CON CÁNCER CERVICOUTERINO.

**T E S I S**

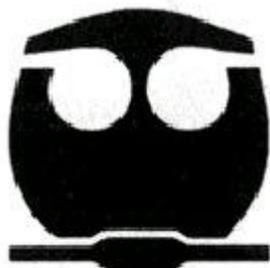
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

**WENDY BEATRIZ PÉREZ BÁEZ**

Tutor: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá



MÉXICO, D. F.

Noviembre/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, en el Laboratorio de Virus y Cáncer, en el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

<b>Dr. Alejandro Manuel García Carrancá</b>	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
<b>Dr. Jorge Vázquez Ramos</b>	Facultad de Química, UNAM
<b>Dr. Rosa Estela Navarro González</b>	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce como **Asesora técnica y académica** a la **Dra. Martha Martínez Salazar** en todo lo realizado durante el desarrollo de esta tesis.

También se reconoce la colaboración y el apoyo técnico del **M. en C. Jorge Organista Nava**, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados – IPN.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 30 de Noviembre de 2012.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	<b>Dr. Alejandro Zentella Dehesa</b>	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	<b>Dr. Mauricio Salcedo Vargas</b>	IMSS, CMN S-XXI
Vocal	<b>Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas</b>	Instituto Nacional de Cancerología
Vocal	<b>Dra. Martha Martínez Salazar</b>	Instituto Nacional de Cancerología
Secretario	<b>Dra. Martha Robles Flores</b>	Facultad de Medicina, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, que es mi guía, mi motivación, mi ejemplo y mi apoyo, le agradezco infinitamente la atención y cuidados que nos brindas a Miguel y a mí, la paciencia y confianza que tuviste para esperarme hasta la madrugada que regresaba del laboratorio, y por la disciplina con la que me educaste ya que gracias a ello he podido levantarme de muchos tropiezos.

A mi padre, mi querido viejo y amigo, agradezco su apoyo incondicional para poder realizar este y otros proyectos, por el cuidado, cariño y atención que le das a Miguel cuando yo tengo que dedicarme a mi trabajo y porque con tu bondad y temple ante los grandes problemas que surgieron en tu trabajo me enseñaste que debía seguir adelante pese a lo difícil que parecieran los obstáculos y que estaba permitido caerse pero jamás quedarse en el suelo.

A mi niño lindo y adorado Miguel. A ti te agradezco por ser la razón más importante de mi existencia, por que sin ti nada tendría sentido, por que a pesar de los problemas tan difíciles que hemos atravesado siempre muestras confianza, me das amor, paciencia y cariño. Te amo y lucharé por ti y para ti... Hasta la victoria siempre!!

Luis Martínez Manzanita, gracias por ofrecerme tu mano que me levantó cuando sentía que ya se había terminado mi recorrido y por tu infinito apoyo para salir de los problemas tan fuertes que se suscitaron, por que con nada podría recompensar todo lo que hiciste por nosotros.

A Dios agradezco haberme llenado de bendiciones al permitirme pertenecer al grupo Alquimia XXI, además agradezco infinitamente por haberme permitido coincidir en esta vida con Blanquita Quiza, gran persona, mujer y amiga, que ha luchado incansable e incondicionalmente a mi lado, me ha motivado para creer que este sueño es posible, me ha hecho creer en los milagros, en la esperanza, en la fe, en la solidaridad y en la amistad. Espero que la vida me permita pagarle aunque sea un poco de todo lo que ha hecho por mí.

A Martha Martínez Salazar agradezco su confianza, sus consejos, su tiempo, su cariño y por permitirme ser además de su pupila, su amiga, y compartir libros, trabajo, risas, desvelos, sueños, llanto y proyectos futuros, eres un gran ejemplo y mi meta a seguir amiguita.

A mis tíos Humberto y Esperanza que son mis segundos padres, agradezco por todas y cada una de las cosas que me comparten, por la confianza que me tienen, por que a pesar de todas las cosas que suceden siempre están presentes para ayudarnos.

A Paty Pavón, a Sylvia Galindo, a Carmen Rivera Blanco, a Ignacio Piña y a Blanquita Quiza agradezco por haberme hecho sentir parte de ustedes, por su amistad, por todo lo que me enseñaron e inculcaron, por su cariño, por toda la confianza y valor que me brindaron cuando me sentía perdida y que no podía más. Espero ser digna de todo esto.

A Chio, a Peter, a Vero, a Paty, a Veverly, a Grace, a Jorge y a Rodolfo, compañeros y amigos en el INCan por su esencial apoyo en cada uno de los experimentos realizados en este trabajo, por las horas, desvelos, risas y sueños compartidos, y porque con su ejemplo me motivan a seguir.

**Los Heraldos Negros  
(1918)**

Hay golpes en la vida, tan fuertes... Yo no sé.  
Golpes como del odio de Dios; como si ante ellos,  
la resaca de todo lo sufrido  
se empozara en el alma... Yo no sé.

Son pocos, pero son... Abren zanjas oscuras  
en el rostro más fiero y en el lomo más fuerte.  
Serán tal vez los potros de bárbaros Atilas;  
o los heraldos negros que nos manda la Muerte.

Son las caídas hondas de los Cristos del alma,  
de alguna fe adorable que el destino blasfema.  
Esos golpes sangrientos son las crepitaciones  
de algún pan que en la puerta del horno se nos quema.

Y el hombre... Pobre... pobre! Vuelve los ojos, como  
cuando por sobre el hombro nos llama una palmada;  
vuelve los ojos locos, y todo lo vivido  
se empoza, como un charco de culpa, en la mirada.

Hay golpes en la vida, tan fuertes... Yo no sé!

**César Vallejo**

(Perú, 1892-Paris, 1938)

**ÍNDICE GENERAL**

**Índice** ----- **6**

**Lista de Figuras** ----- **8**

**Resumen** ----- **9**

**Glosario** ----- **11**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN -----	12
1.1. Cáncer	
1.2. Cáncer Cérvico Uterino	
1.3. Teorías de Carcinogénesis	
1.4. Células troncales, definición.	
1.5. Factores de Pluripotencia	
1.6. Teoría de la Célula Troncal de Cáncer	
2. JUSTIFICACIÓN-----	29
3. OBJETIVOS-----	30
3.1. General	
3.2. Particulares	
4. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS -----	31
5.1. Cultivos celulares	
5.2. RT-PCR	
5.3. Western Blot	
5.4. RT-qPCR	
5.5. Obtención y selección de muestras clínicas de CaCU	
5.6. Inmunohistoquímica	
6. RESULTADOS -----	35
6.1. Análisis <i>in silico</i> para el diseño de oligonucleótidos, extracción de RNA y obtención de cDNA.	
6.2. Análisis de la expresión de los mensajeros de Oct-4, Sox-2 y Nanog en teratocarcinoma (NCCIT).	
6.3. Análisis de la expresión de los mensajeros de Oct-4, Sox-2 y Nanog en las diferentes líneas celulares (NCCIT, HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT).	
6.4. Análisis de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog en la línea celular NCCIT.	
6.5. Análisis de la expresión proteica de Oct-4, Sox-2 y Nanog en las diferentes líneas derivadas de CaCu ( HeLa, SiHa, CaSki), NCCIT y HaCaT.	
6.6. Análisis de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog en las diferentes líneas derivadas de CaCU (HeLa, SiHa, CaSki), NCCIT y HaCaT.	

6.7. Análisis cuantitativo de la expresión relativa de Oct-4, Sox-2 y Nanog usando RT-qPCR en las diferentes líneas derivadas de CaCu ( HeLa, SiHa, CaSki), NCCIT y HaCaT.	
6.8. Análisis cuantitativo de la expresión relativa de Oct-4, Sox-2 y Nanog en poblaciones enriquecidas (Esferas) derivadas de la línea celular SiHa.	
6.9. Evaluación de la expresión de la proteína OCT-4 por Inmunohistoquímica en cortes histológicos de Disgerminoma de Ovario.	
6.10. Evaluación de la expresión de la proteína Oct-4 por Inmunohistoquímica en cortes histológicos de Cérvix Humano con diferentes lesiones.	
7. DISCUSIÓN -----	<b>46</b>
8. CONCLUSIONES -----	<b>50</b>
9. PERSPECTIVAS -----	<b>51</b>
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia del CaCU.-----	13
Figura 2. Modelos de Tumorigénesis.-----	15
Figura 3. Tipos de Células troncales.-----	18
Figura 4. Características claves en la regulación de la Pluripotencia.-----	20
Figura 5. Estructura de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog.-----	20
Figura 6. La regulación del estado de Pluripotencia. -----	22
Figura 7. Redes regulatorias de los factores transcripcionales.-----	24
Figura 8. Células troncales cancerosas. -----	25
Figura 9. Escenarios que implican células troncales cancerosas.-----	27
Figura 10. Estrategias empleadas para la identificación y aislamiento de células tumorigénicas. -----	28
Figura 11. Estructura esquemática de el gene humano de Oct-4.-----	35
Figura 12. RNA extraído y obtención de cDNA.-----	36
Figura 13. RT-PCR de Oct-4, Sox-2 y Nanog en la línea celular NCCIT. -----	37
Figura 14. RT-PCR de Oct-4 en las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino. -----	38
Figura 15. Estandarización de Western Blot usando el anticuerpo contra $\beta$ Actina.----	39
Figura 16. Estandarización de Western Blot usando los anticuerpos contra Oct-4, Sox-2 y Nanog en la línea celular NCCIT. -----	39
Figura 17. Western Blot para Oct4, Sox-2 y Nanog en Diferentes líneas celulares derivadas de CaCU. -----	40
Figura 18. RT- qPCR de Oct-4, Sox-2 y Nanog en las líneas celulares derivadas de Cáncer Cérvico Uterino. -----	41
Figura 19. Cultivo de agregados celulares no adherentes derivados de la línea celular SiHa, y medida de su capacidad de autorrenovación <i>in vitro</i> .-----	42
Figura 21. RT- qPCR de Oct-4, Sox-2 y Nanog en poblaciones enriquecidas derivadas de la línea celular SiHa.-----	43
Figura 20. Inmunodetección de Oct-4 en disgerminoma de Ovario.-----	44
Figura 21. Inmundetección de Oct-4 en biopsias de Cérvix con diferentes lesiones.--	46

## RESUMEN

**Antecedentes.** Actualmente se ha sugerido que los tumores son generados por una subpoblación minoritaria de células denominadas Células troncales tumorales, células troncales cancerosas o CTC (por sus siglas en inglés Cancer Stem Cells), las cuales poseen la capacidad de autorrenovarse y se caracterizan por diferenciarse aberrantemente y generar todas las distintas células que componen un tumor. Estas células requieren de un perfil único de expresión de factores de transcripción para poder mantener sus características de troncalidad. Hasta ahora, factores de transcripción claves han sido identificados como esenciales para la identidad de las células troncales embrionarias, incluidos Nanog y Oct-4 que son dos proteínas homeodominio, y Sox-2 un factor HMG (High Mobility Group), los cuales se unen al DNA. Puesto que los mecanismos moleculares que determinan las características de troncalidad han sido estudiados fundamentalmente en células hematopoyéticas y algunos tumores sólidos, consideramos interesante iniciar el análisis de expresión de estos reguladores maestros en células derivadas de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), neoplasia que constituye un problema de Salud Pública importante y representa la segunda causa de muerte por cáncer en Latinoamérica.

**Objetivo.** Realizar el análisis de expresión de los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog en líneas celulares y biopsias asociadas con cáncer cérvico uterino.

**Material y métodos.** Se realizó el análisis de la expresión de los genes Oct-4, Nanog y Sox-2 a nivel de mensajero y proteína usando RT-PCR, RT-qPCR y Western Blot respectivamente, en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki); como control positivo de expresión de estos genes se utilizó la línea celular NCCIT (línea celular derivada de un teratocarcinoma) y HaCaT se usó como control negativo. Además se realizó el análisis de expresión de Oct-4 usando la técnica de Inmunohistoquímica en tejidos humanos de cáncer de cérvix en diferentes estadios (Sin lesión aparente, NIC-I, NIC-II, NIC-III, Cáncer in situ y Cáncer Invasor), usando como control positivo de expresión una biopsia de disgerminoma de ovario.

Finalmente se realizó el análisis de la expresión de los genes Oct4, Nanog y Sox-2 usando RT-qPCR en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas mediante la formación de Esferas no adherentes derivadas de la línea celular SiHa.

**Resultados.** En las líneas celulares derivadas de CaCU hubo expresión de los factores de transcripción Sox-2 y Nanog, y no se detectó expresión de Oct-4. En cambio, en poblaciones enriquecidas y a partir de lesiones premalignas, la proteína Oct-4 aumenta su expresión. Los factores Sox-2 y Nanog aumentan su expresión a nivel de mensajero y proteína en líneas celulares y en las poblaciones enriquecidas. Por lo tanto, los resultados sugieren que Oct-4, Nanog y Sox-2 podrían estar dirigiendo los mecanismos de autorrenovación celular y mantenimiento de la

troncalidad en estas poblaciones y por lo tanto relacionarse con el desarrollo y mantenimiento de esta neoplasia.

**Conclusión.** En poblaciones enriquecidas por formación de esferas no adherentes hay un aumento en la expresión relativa del transcrito para los factores relacionados con el mantenimiento de la troncalidad Oct-4, Sox-2 y Nanog. Lo que sugiere que en esta neoplasia existe una subpoblación de células con características de troncalidad, relacionadas con el proceso de carcinogénesis.

## **GLOSARIO**

**Oct-4.-** Octamer-binding transcription factor 4

**Sox-2.-** Sex-determining region Y-box 2

**Nanog.-** proteína Homeotica Nanog (hNanog)

**CSC.-** Cancer Stem Cell

**HMG.-** High mobility group

**CaCU.-** Cáncer Cérvico uterino

**ESC.-** Embryonic Stem Cell

**POU.-** Pit-1, Oct-1/2 and Unc-86.

## **1. INTRODUCCIÓN**

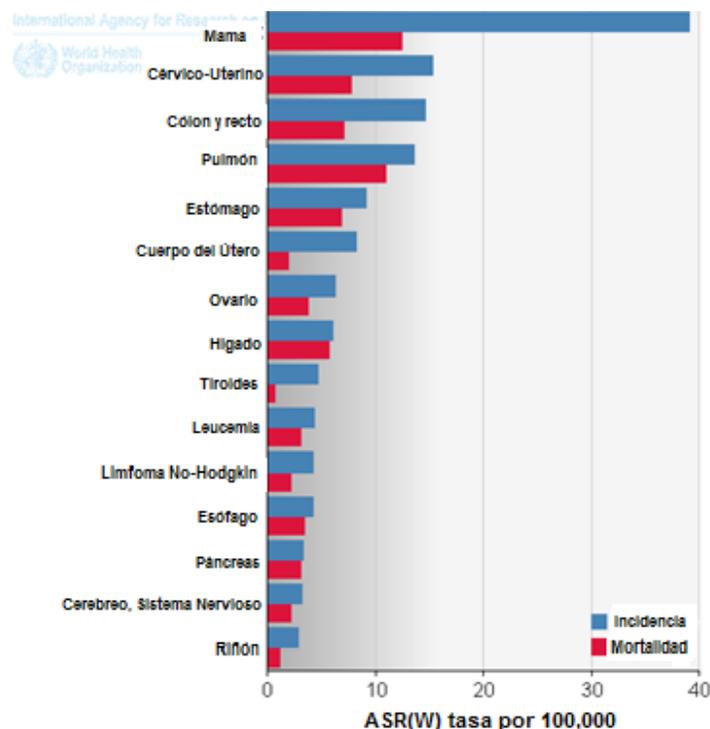
### **1.1. Cáncer**

El Cáncer es la segunda patología que ocasiona mayor número de muertes en el mundo, superada únicamente por las enfermedades cardiovasculares. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), de cada 100 personas que pierden la vida al año, 13 mueren por esta enfermedad.

El cáncer también es la segunda causa de mortalidad en el país; muchos son los factores que explican esta incidencia, tales como variables genéticas, de medio ambiente, nuevos modos de vida, hábitos alimenticios e, incluso, las relacionadas con la llamada vida moderna como el estrés. No obstante, los avances que la Ciencia y la Tecnología han desarrollado para disminuir los efectos de las células cancerosas en el organismo, aún sigue siendo un reto para la investigación descubrir el origen y desarrollo de esta enfermedad. Lo indiscutible es que todo este conocimiento arrojará información más adecuada para mejorar la eficacia de las terapias de las que actualmente disponemos [1].

### **1.2. CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

El cáncer cérvico uterino o cáncer cervical (CaCU) es una de las enfermedades neoplásicas de mayor importancia a nivel mundial ya que ocupa el segundo lugar entre las neoplasias malignas más frecuentes en mujeres con cerca de 530, 232 nuevos casos al año y más de 274, 000 muertes (Figura 1) [2]. Es considerado como una enfermedad de la pobreza y de la inequidad de género, ya que la infraestructura física y de recursos humanos que otorgan los servicios de atención primaria en los países subdesarrollados no son los adecuados, reflejándose estas deficiencias en las tasas de incidencia y de mortalidad de esta enfermedad [3].



**Figura 1. Tasa de incidencia del cáncer Cérvico uterino en el mundo. Globocan 2008, Todas las edades [2].**

Dentro de las neoplasias que afectan a la población femenina de México, ésta también se ubica como la segunda causa de muerte (con una mortalidad de 12.9%) y se producen más de 10,100 nuevos casos al año [2], por lo que es considerada como un problema de Salud Pública. En los últimos años se han desarrollado campañas de prevención, diagnóstico y tratamiento oportuno en México, con el objetivo de reducir los altos índices de mortalidad y morbilidad, sin embargo situaciones sociales y culturales han mermado los resultados esperados [4].

A pesar de que el desarrollo de la vacuna contra el Virus de Papiloma Humano ha sido un gran avance en la profilaxis de la infección, no ha mostrado tener efectos terapéuticos notables, siendo de poco impacto en mujeres que ya han desarrollado la neoplasia.

### 1.3. Teorías de Carcinogénesis

Es bien sabido que, a diferencia del tejido normal, los tumores están compuestos de una población heterogénea de células que difieren en su aparente grado de diferenciación. Este grado de diferenciación así como la morfología y la arquitectura celular, son usados por los patólogos para definir el origen de los tumores. Este hecho simple sugiere que los tumores no son sólo la expansión de células monoclonales, sino que en realidad podrían ser semejantes a “órganos anormales”.

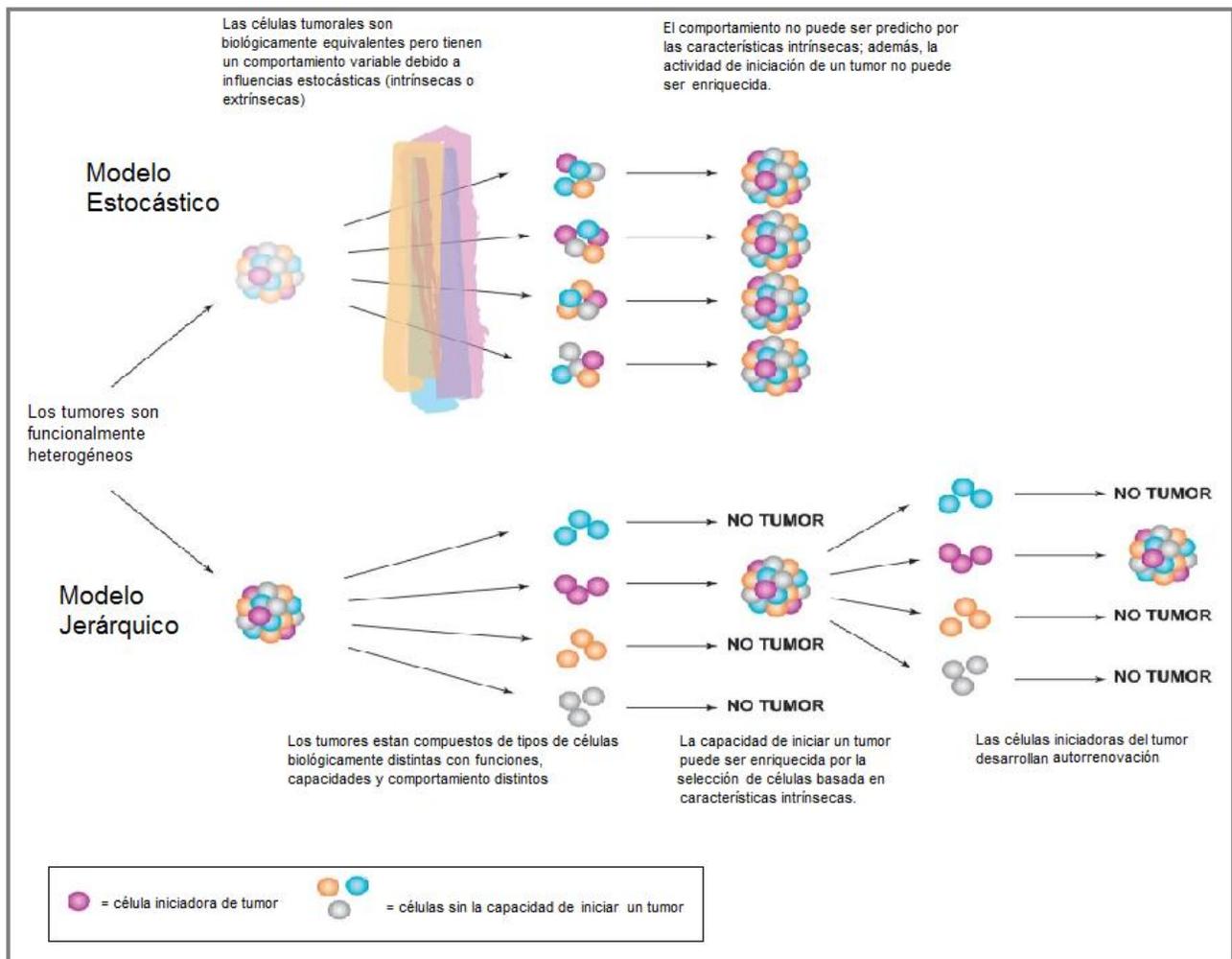
A finales del siglo XIX, a partir de observaciones morfológicas realizadas por Rudolf Virchow y Julius Cohnheim, es reconocido que los tumores exhiben marcada heterogeneidad celular. En un tumor existen poblaciones celulares con características fenotípicas variadas manifestándose, entre otras, por su morfología y su expresión proteica. De la misma forma, las poblaciones celulares que forman parte de un tumor presentan características funcionales particulares, reflejadas en su grado de proliferación, tumorigenicidad y capacidad metastásica, entre otras [5].

Esta heterogeneidad celular tumoral se ha intentado explicar a partir de modelos de carcinogénesis que sugieren que los tumores se originan de una serie de eventos mutacionales, o modificaciones epigenéticas, como resultado de una inestabilidad genética y/o de factores ambientales que afectan a las células normales. Dos modelos descritos a continuación explican este hecho:

A. **Modelo estocástico:** postula que cualquier célula que conforma la masa tumoral tiene la capacidad de formar nuevos tumores, debido a la heterogeneidad celular de poblaciones celulares con características biológicas equivalentes, como producto de la selección y expansión de clonas con ventajas de crecimiento [5].

B. **Modelo Jerárquico:** establece que la heterogeneidad celular de una masa tumoral se deriva de poblaciones celulares con diferentes características fenotípicas y funcionales en donde una población, muy pequeña en la mayoría de casos, tiene la capacidad de formar nuevos tumores. A esta población celular se le ha denominado “Células tumorigénicas iniciadoras de cáncer o troncales tumorales”. Esto debido a que las células troncales son las únicas células de vida larga en muchos tejidos y por lo tanto los candidatos naturales que podrían acumular mutaciones y producir la transformación celular. En este modelo la Célula Troncal de Cáncer es el ápice de la tumorigenesis [6].

En la Figura 2 se muestran un esquema que ejemplifica ambos modelos.



**Figura 2. Modelos de Tumorigénesis.** a) *Modelo Estocástico*: cualquier célula puede proliferar extensamente y formar tumores. b) *Modelo Jerárquico*: sólo el subgrupo de células troncales de cáncer (CTC) tiene la habilidad para proliferar extensamente y formar nuevos tumores [7].

#### 1.4. Células troncales

Las células troncales son células primitivas comunes a todos los organismos multicelulares que mantienen la capacidad de autorrenovarse a través de divisiones celulares y pueden diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares especializados. Muchos tejidos humanos experimentan un rápido y continuo recambio celular a través de procesos estrictamente regulados de renovación. Bajo condiciones fisiológicas este proceso se mantiene por una pequeña población de células de vida larga con un extraordinario potencial de expansión.

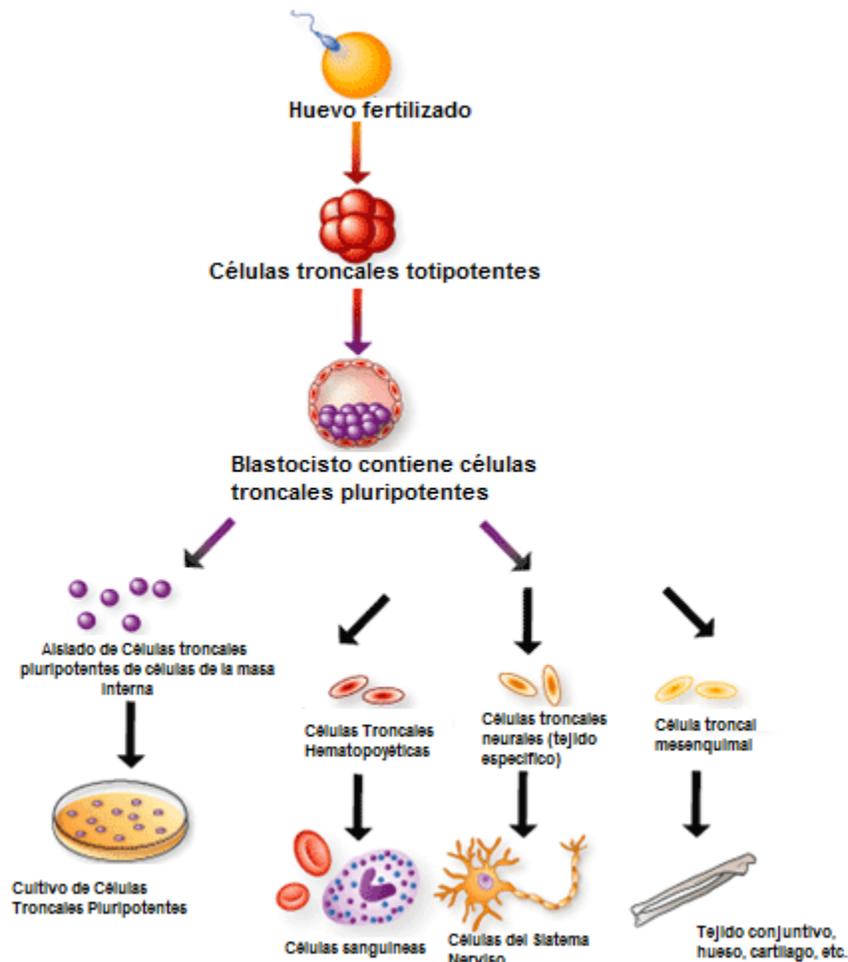
Las células troncales están definidas por las siguientes propiedades principales [8]:

1. *Autorrenovación*: la capacidad para formar nuevas células troncales idénticas, con el potencial intacto para proliferación, expansión, y diferenciación, de este modo se conserva la poza de células troncales. Esto resulta de una división asimétrica en la cual se produce una célula hija con potencial de diferenciación (progenitora) y otra hija idéntica a la célula troncal que aún conserva sus características.
2. *Potencial de diferenciación*: se refiere a la capacidad para dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente se diversifican y especializan de acuerdo a procesos jerárquicos, reponiendo constantemente los tejidos de vida corta con elementos maduros. Inicialmente mantienen muchas características de sus progenitoras, pero subsecuentemente pierden el potencial de auto-renovación en cada división hasta dar origen a células maduras diferenciadas. Esto hace que también tengan un importante papel en la reparación de tejidos.
3. *Control homeostático*: la capacidad para modular y balancear la diferenciación de la autorrenovación de acuerdo con la estimulación del medio ambiente y las limitaciones genéticas [8].

En virtud de la importancia fundamental que tienen las células troncales en la organogénesis de los tejidos a los que pertenecen, las células troncales han desarrollado mecanismos que promueven su supervivencia y resistencia a apoptosis. Hay muchos mecanismos moleculares que pueden considerarse para la resistencia a la apoptosis y que estarían estrechamente relacionados con la resistencia terapéutica de las CSCs y éstas incluyen: a) *cinética del ciclo celular*: muchas de las células troncales no son cíclicas y están en  $G_0$ , y a consecuencia de esto son resistentes a agentes quimioterapéuticos ciclo-específicos; b) *mecanismos de replicación y reparación de DNA*: las células troncales pueden ser resistentes a agentes que producen daño a DNA en virtud de ser capaces de desarrollar síntesis asincrónica de DNA y además, muestran una mejor capacidad de reparación de DNA; c) *Proteínas antiapoptóticas*: las células troncales expresan altos niveles de proteínas antiapoptóticas, tales como miembros de la familia Bcl-2 e inhibidores de la apoptosis, en comparación con las células diferenciadas; d) *proteínas transportadoras*: un mecanismo de resistencia innato de las células troncales es el aumento en la expresión de uno o más transportadores ABC (de sus siglas en inglés ATA-binding cassette), tales como ABCG2 (BCRP), también como P-glicoproteínas [9].

Las células troncales se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y progenitoras o específicas de tejido, de acuerdo al grado de diferenciación en el que se encuentren (Figura 3), a continuación se explican algunas de sus características principales:

- Las **células troncales totipotenciales** tienen la capacidad de dar origen a todas las células de un embrión completo; es decir, originan los tejidos propios del embrión, como el ectodermo, endodermo y mesodermo; y los tejidos extraembrionarios como el saco vitelino, alantoides, amnios y corion. No se ha demostrado *in vitro* que las células totipotenciales sean autorrenovables. Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito, formando la célula diploide que se conoce como cigoto, la cual se caracteriza por ser totipotencial.
- Las **células troncales con capacidad pluripotente** (células troncales embrionarias, ES) derivan de la masa interna del blastocisto y pueden dar origen a todos los tipos celulares de un organismo.
- Las **células troncales multipotentes** son células autorrenovables más diferenciadas que las anteriores y proliferan para producir células diferenciadas que formarán algún tejido *in vivo*.
- Las **células específicas de tejido o progenitoras** son células con restricción en la expresión de su genoma, en comparación con las pluripotenciales, tienen mayor grado de diferenciación y producen tipos celulares característicos del tejido, el cual se observa *in vitro* [10-14].



**Figura 3. Tipos de Células troncales.** Las células troncales embrionarias (ES) poseen un vasto potencial de desarrollo que les permite la capacidad de autorrenovación y dar origen a cualquier tipo celular dentro de un organismo. Las células troncales somáticas son células indiferenciadas encontradas entre diferentes células de un tejido específico y se considera que son multipotentes [14].

Algunos estudios en distintos modelos sugieren que las células troncales están localizadas en lugares específicos o nichos. El nicho es un microambiente único que es requerido para la función específica de las células troncales [15].

### 1.5. Pluripotencia y Diferenciación

La pluripotencia es la capacidad de una Célula Troncal Embrionaria (ESC) de dar origen a todas las células del embrión y del adulto, ya sea en cultivo o en el embrión en desarrollo, se mantiene por un breve período durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, en las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto y en el epiblasto del embrión pre gastrulación; se preserva

también en los primordios de las células germinales durante el desarrollo tardío hasta la etapa adulta. La pérdida de la pluripotencia y la diferenciación a linajes celulares específicos conlleva cambios en los patrones de expresión génica que incluyen el silenciamiento de genes que codifican para factores de transcripción claves para el mantenimiento de la pluripotencia, la expresión de genes inductores de la diferenciación y cambios epigenéticos de la cromatina. En cambio, las células troncales somáticas son células indiferenciadas encontradas en tejidos adultos y se considera que son multipotentes ya que se diferencian menos que las células pluripotentes [16].

### **1.5.1. Regulación del estado de pluripotencia y diferenciación**

Las células troncales embrionarias (ESC) con capacidad pluripotente y continua autorrenovación requieren del mantenimiento de un perfil único de expresión de factores de transcripción para el estado pluripotente. En contraste, para diferenciarse a diversos linajes, las ESC deben cambiar a un perfil de expresión de factores transcripcionales alternativo. Ambos, regulación transcripcional y regulación epigenética juegan un rol fundamental en el mantenimiento y control de la plasticidad del perfil transcripcional existente. Además, micro-RNAs (miRNAs), nuevos reguladores de la expresión génica, han surgido como reguladores clave del estado pluripotente [16], como se puede observar en la Figura 4.

Está claro que ambos factores de regulación, epigenética y de transcripción, son dos mecanismos esenciales para el estado pluripotente. En la Figura 4, se resumen las redes regulatorias claves de la pluripotencia. En ESC, los factores transcripcionales de pluripotencia trabajan junto con reguladores epigenéticos para activar genes involucrados en el mantenimiento del estado pluripotente y para reprimir los genes involucrados en el desarrollo. Aunque los genes que controlan la diferenciación están transcripcionalmente inactivos, se mantienen en estado potencialmente activo para su transcripción. También, la estructura cromatínica hiperdinámica en las ESC ayuda a la rápida modificación del perfil transcripcional, facilitando la plasticidad y el potencial de diferenciación multilinaje [17].

Con relación al proceso de diferenciación, los factores de pluripotencia disminuyen gracias a un perfil característico de miRNAs, dando un cambio dramático en el perfil de transcripción, mientras los genes requeridos para mantener la pluripotencia son silenciados. Los genes relacionados con la diferenciación están regulados por múltiples vías, donde algunos están activados mientras que el resto se mantiene inactivo. Entre la inactivación de genes, algunos perderán la marca epigenética asociada con el potencial de activación transcripcional y se convertirá entonces en

resistente a activación. Entre tanto, la cromatina en células diferenciadas se vuelve más compacta, lo cual correlaciona con la disminución en el potencial de diferenciación y restricción a linaje [16].

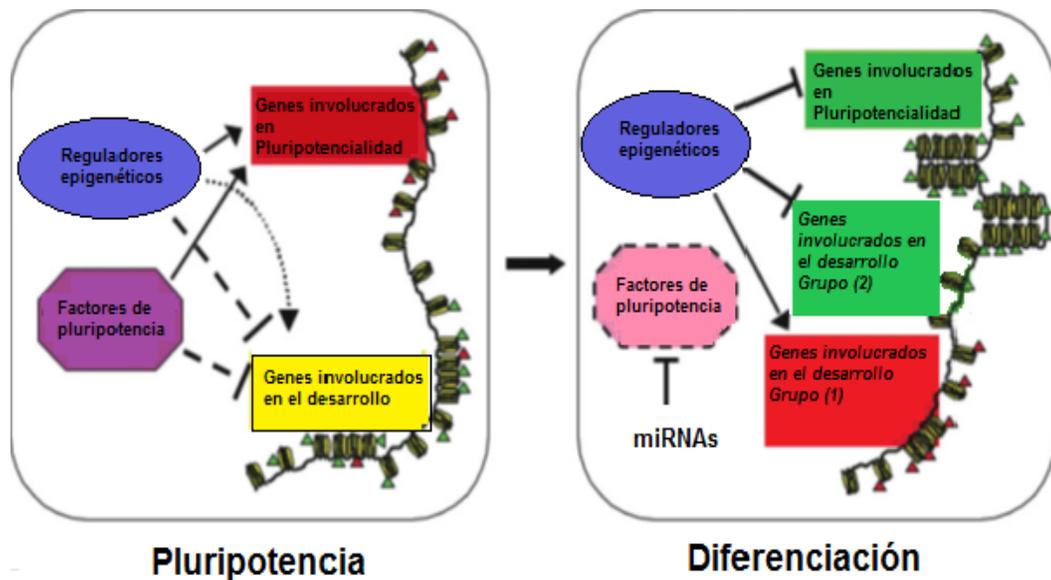


Figura 4. Características claves en la regulación de la pluripotencia [17].

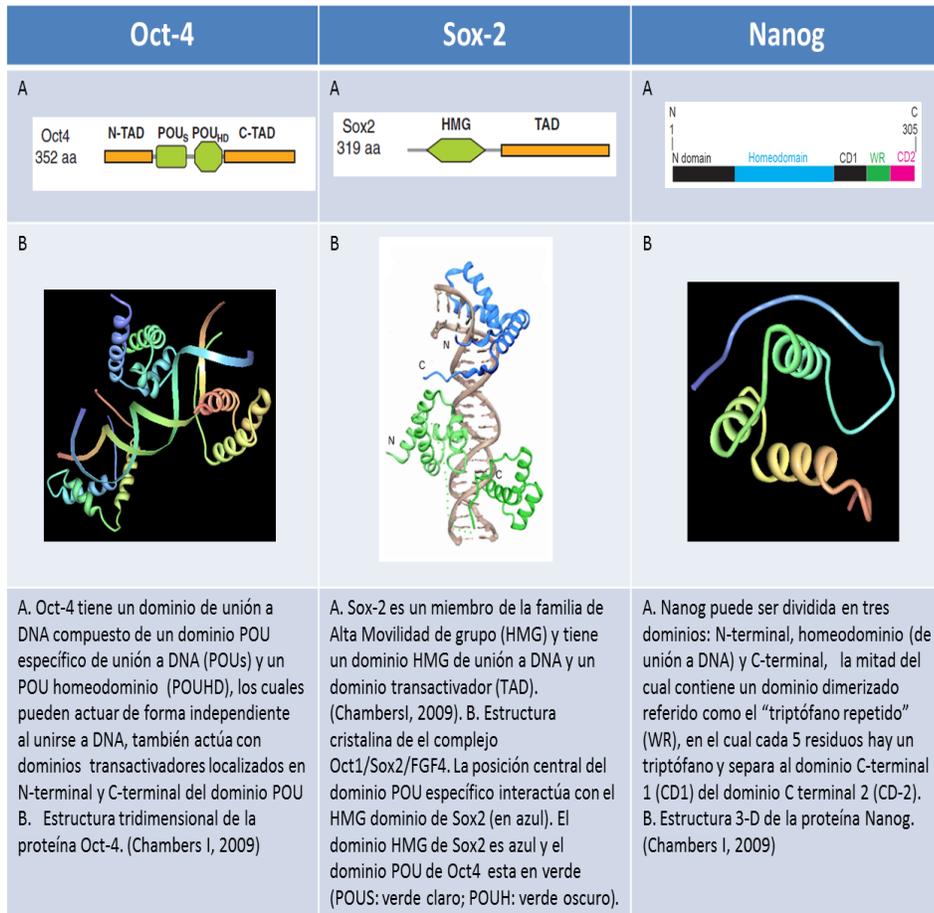
### 1.5.2. Factores transcripcionales que regulan el estado de pluripotencia y diferenciación: Oct4, Sox2, y Nanog

En estudios experimentales tempranos para investigar los mecanismos moleculares de la pluripotencialidad, se propuso que las células pluripotentes expresan un único grupo de factores que son la base de su troncalidad. Estos, también llamados factores de pluripotencialidad no solo sirven como marcadores de las células pluripotentes, sino que son funcionalmente importantes para mantener su estado pluripotente.

Sorprendentemente un número muy pequeño de factores de transcripción son responsables de regular el desarrollo de un organismo entero. Estos factores de transcripción forman complejos multiméricos de proteínas que se unen a DNA y de ese modo dirigen la correcta expresión temporal y espacial de genes involucrados en el desarrollo. Este proceso conduce al establecimiento de asociaciones funcionales que combinan la actividad individual de cada factor y provocando así resultados específicos de transcripción. Miembros de las familias de los factores de transcripción POU y SOX ejemplifican esta cooperatividad durante el desarrollo embrionario temprano. Las proteínas POU y SOX interactúan selectivamente cada una con un dominio específico de unión a DNA. Su cooperatividad funcional ha sido caracterizada en elementos

regulatorios en varias especies. Estas proteínas se expresan diferencialmente durante el desarrollo, y su combinación puede originar la expresión diferencial de genes críticos para determinar el destino del ciclo celular. Los genes que codifican para los factores de transcripción Oct-4 y Sox-2 son altamente regulados durante el desarrollo y en líneas celulares embrionarias. Su combinación es crítica, así como su función para especificar los primeros tres linajes en los embriones de mamíferos.

Dos factores de transcripción Homeodominio, Oct-4 y Nanog fueron las primeras proteínas identificadas como esenciales tanto para el desarrollo embrionario temprano como para el mantenimiento de la pluripotencia en las ESC. Oct-4 es un factor de transcripción que reconoce una secuencia de ADN de 8pb ATGCAAAT [18-19]. Forma parte de los factores de transcripción de la familia POU (Pit, Oct y Unc) los cuales interactúan con el DNA a través de dos dominios de unión [20]. Sox-2, un factor de transcripción HMG-box, forma un heterodímero con Oct-4 para regular muchos genes en ESC. Oct-4, Sox-2 y Nanog comparten una fracción sustancial de genes blanco. Muchos genes blanco de Oct-4, Sox-2 y Nanog codifican para factores de transcripción claves para la diferenciación y el desarrollo, y son transcripcionalmente inactivos en ESC. Oct-4, Sox-2 y Nanog también regulan transcripcionalmente genes activos involucrados en el mantenimiento de pluripotencialidad [17]. En la Figura 5 se resumen las características principales de la estructura de estas proteínas y en la Figura 6 se muestra la interacción entre éstos.



**Figura 5. Resumen de las características estructurales de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog [21].**

Takahashi y Yamanaka (2006) [22], fueron capaces de reprogramar células somáticas a un estado análogo a célula troncal (ES cell-like) mediante la expresión de algunos factores de transcripción características de troncalidad. Ellos identificaron cuatro genes, Oct-4, Sox-2, c-Myc y Klf4 que pueden orquestrar la reprogramación a un estado pluripotente cuando se inducen simultáneamente dentro de fibroblastos adultos de ratón, produciendo células troncales pluripotentes inducidas (iPS). Sin embargo, Grinnell en el 2007 [23], da el primer ejemplo de reprogramación de células somáticas comprometidas a un estado “ES cell-like” con el uso de un solo factor. En particular, los autores demostraron que la transfección transitoria de Oct-4 dentro de queratinocitos basales epidermales foliculares de ratón tienen la capacidad de dotar a la célula con propiedades características de mayor potencial de desarrollo. Además, los queratinocitos transfectados con Oct-4 son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares cuando se exponen a diferentes condiciones de cultivo [22].

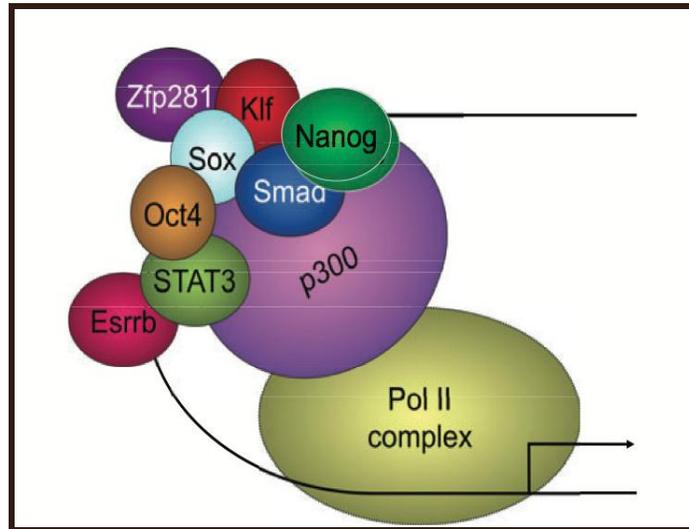


Figura 6. La regulación del estado de pluripotencia está mediada principalmente por Oct-4, Sox-2 y Nanog. Estos factores de transcripción conforman una intrincada red de interacciones a través de la formación de heterodímeros que actúan sobre los promotores de los genes blanco, induciendo la expresión de genes que promueven la pluripotencia e inhibiendo genes que median la diferenciación, además de regular su propia expresión [24].

### 1.5.3. Redes transcripcionales claves para el estado de pluripotencia

A través de diversos estudios, se ha demostrado que los factores de transcripción Oct-4, Sox-2 y Nanog se unen entre sí a sus sitios promotores, a promotores blanco comunes y así mantienen o limitan su expresión formando una red autorreguladora interconectada para conservar las características de autorrenovación y pluripotencia de las células donde se encuentran. De los genes a los que se une Oct-4, la mitad de ellos también son reconocidos por Sox-2. Por otra parte, > 90% de las regiones promotoras de unión a Oct-4 y Sox-2 son también unidas por Nanog. En total, 352 genes son unidos simultáneamente por Oct-4, Sox-2 y Nanog en células embrionarias indiferenciadas. Además, se sugiere que Oct-4, Sox-2 y Nanog se unen también a sus propios promotores, por lo tanto forman una red interconectada de autorregulación, ver Figura 7. Estos hallazgos demuestran que estos factores trabajan conjuntamente, más que individualmente, para controlar un conjunto de genes blanco y así salvaguardar las propiedades de las células troncales [25].

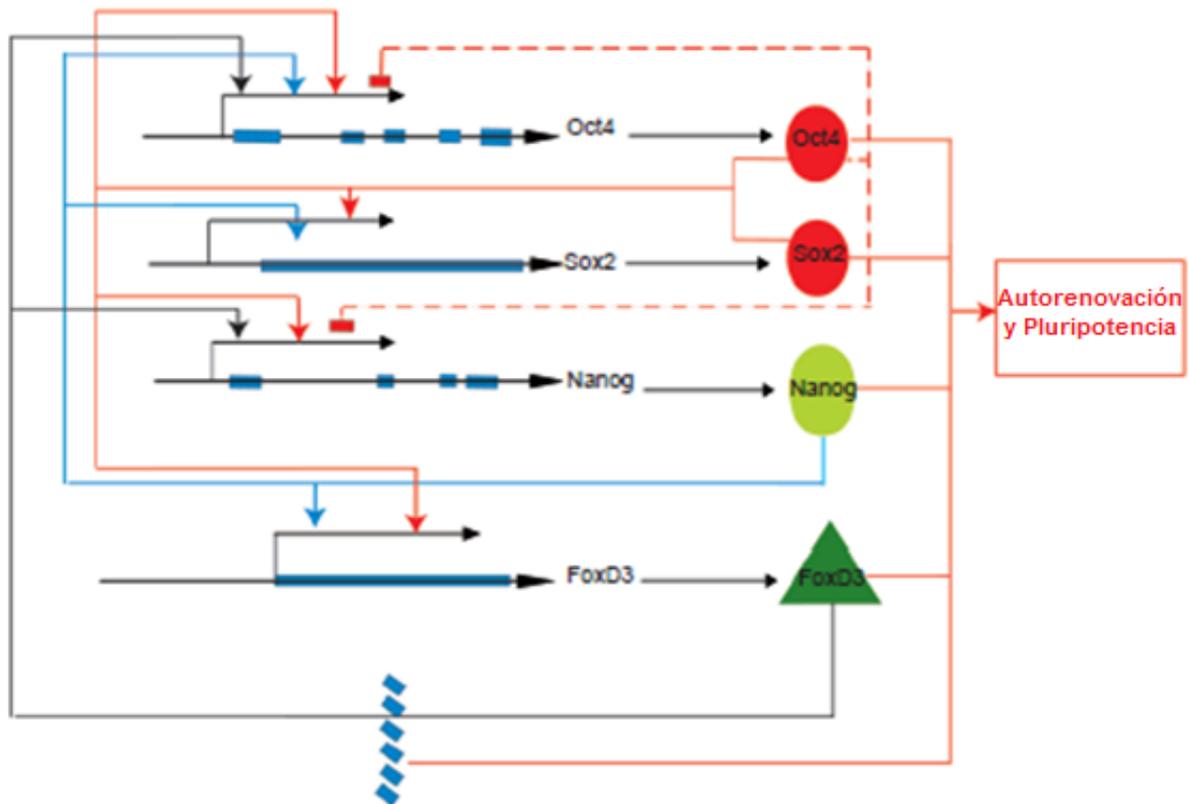


Figura 7. Redes regulatorias de los factores transcripcionales clave para el mantenimiento del estado pluripotente y la autorrenovación en células troncales embrionarias. Las flechas conectadas a los factores por líneas sólidas indican regulación positiva de un promotor por los otros factores y las líneas discontinuas unidas a Oct-4 indican regulación negativa [25].

### 1.6. Teoría de la Célula Troncal de Cáncer (Cancer Stem Cells)

En el año 2006, la Asociación Americana de Investigación en Cáncer definió a una Célula Troncal del Cáncer como una célula que posee la capacidad de autorrenovarse y generar los diferentes linajes celulares que componen un tumor [26].

Algunas observaciones clave definen la existencia de una población de células troncales tumorales:

1. Sólo una minoría de células dentro de un tumor está dotada con potencial tumorigénico cuando son transplantadas a un ratón inmunodeficiente.
2. La tumorigenicidad de las células cancerosas está caracterizada por un perfil particular de marcadores de superficie, y pueden distinguirse y aislarse reproduciblemente de las no tumorigénicas por citometría de flujo u otros procedimientos de inmunoselección.

3. Los tumores crecen a partir de células tumorigénicas contenidas en poblaciones mixtas de células tumorigénicas y no tumorigénicas, de este modo se recrea un fenotipo heterogéneo total del tumor primario [7].

Estas células han sido nombradas Células Troncales Cancerosas para reflejar sus propiedades troncales (stem-like) y su capacidad para mantener la tumorigenicidad, pudiendo dar origen así a una progenie heterogénea similar en composición al tejido del cual fueron aisladas inicialmente [27]. En muchos casos, no es posible definir con certeza la relación genealógica entre las células troncales cancerosas y las células troncales normales de los tejidos correspondientes. Dados estos hechos, es posible que la CTC se origine por mutaciones de células troncales normales; sin embargo, existen evidencias que indican que las CTC también pueden originarse de células progenitoras, conocidas como células amplificadoras transitorias ( del inglés “*transit-amplifying cells*”) que pueden poseer capacidad replicativa sustancial y pueden adquirir, a través de cambios genéticos y epigenéticos, la recuperación de la propiedad de autorrenovación (Figura 8) [7, 27-28].

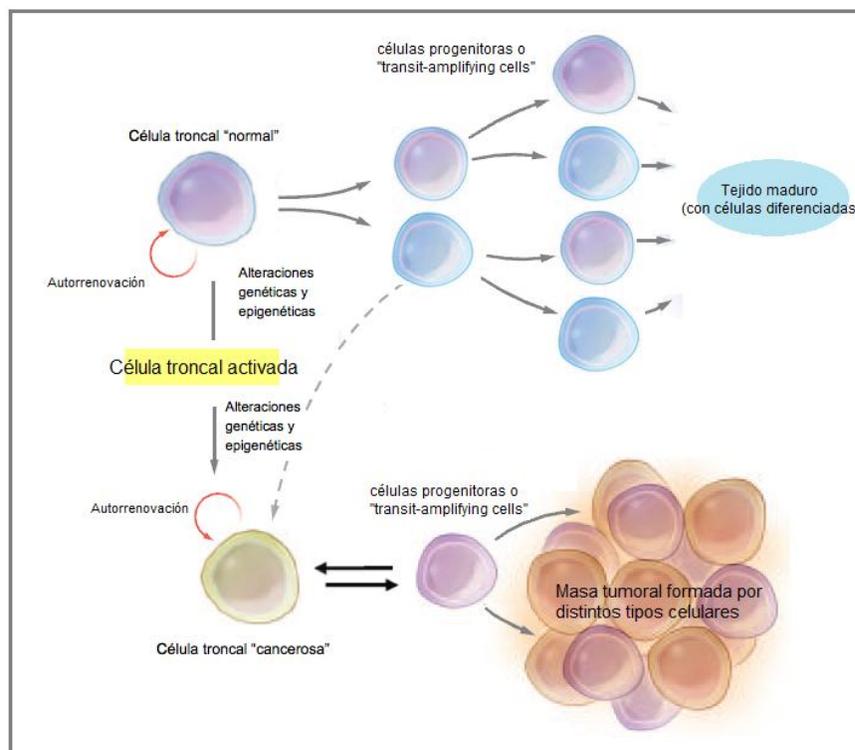
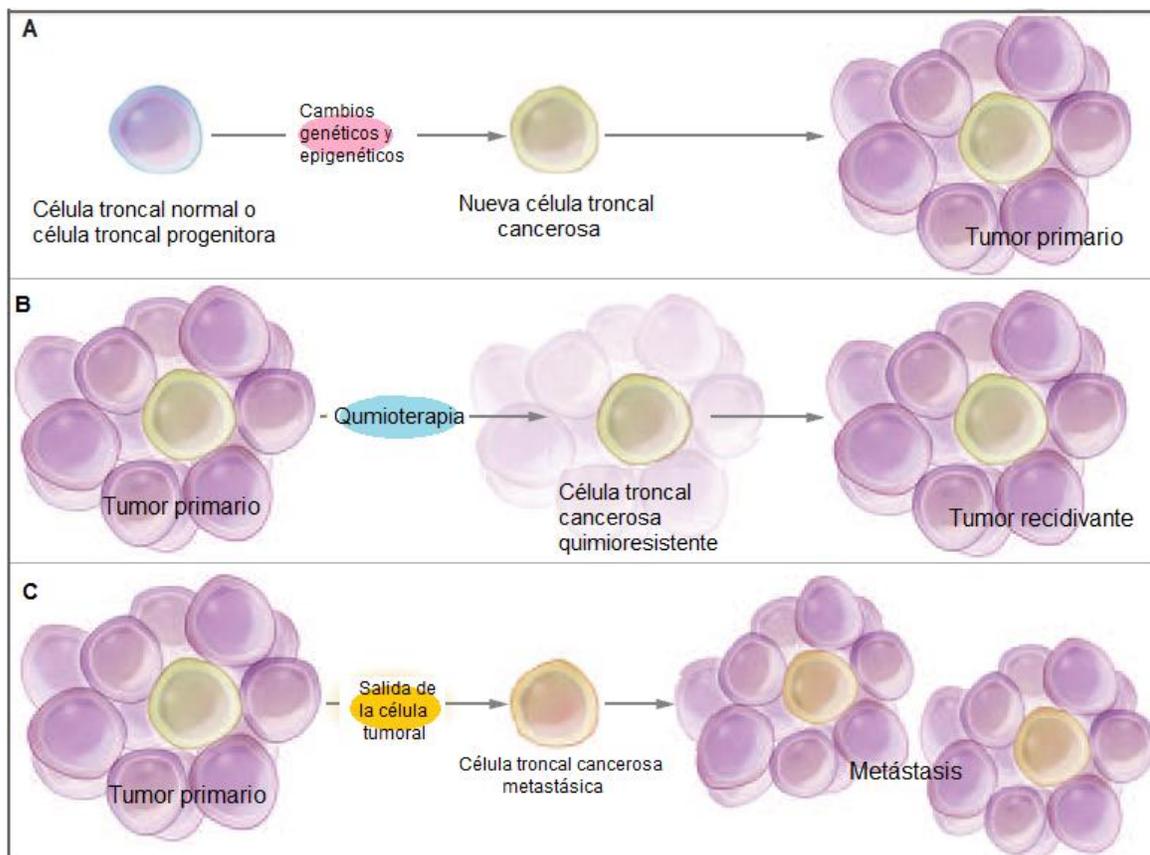


Figura 8. Células troncales cancerosas. Un tejido normal se origina de una célula troncal con capacidad proliferativa que puede autorrenovarse y diferenciarse para dar origen a células progenitoras, las cuales a su vez darán origen al resto de células maduras que conforman un tejido. La Célula troncal cancerosa(CTC) se origina por medio de alteraciones genéticas y epigenéticas en células troncales normales o en células progenitoras que subsecuentemente crecen y se diferencian para formar un tumor primario. Al igual que las células troncales normales, las CTC pueden autorrenovarse o dar origen a poblaciones heterogéneas de células hijas y proliferar extensamente [28-30].

Durante la expansión y tumorigenicidad de las CTC, además de la división asimétrica característica de las células troncales normales, éstas también pueden desarrollar divisiones simétricas en las cuales producen dos células hijas idénticas a la progenitora, y así permiten su expansión. Existe la hipótesis de que la desregulación del proceso de autorrenovación dirige la expansión de las células troncales y puede ser el evento primario clave en el proceso de carcinogénesis. Recientemente, se han descrito rutas metabólicas que regulan el proceso de autorrenovación en células troncales normales, que incluyen las rutas Wnt, Notch y Hedgehog [9, 28].

Las características propias de células troncales hacen que sea particularmente difícil erradicarlas pues muchas de ellas se encuentran en estado quiescente y la mayoría de tratamientos antineoplásicos están dirigidos a células que se dividen rápidamente. Otro hecho importante y característico de las células troncales es que expresan proteínas asociadas con el eflujo de drogas, y se ha visto que las CTC, después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos, expresan estas proteínas, dando como resultado células resistentes a muchos de estos agentes [28]. Al mismo tiempo, sólo una célula troncal normal puede ser resistente a la inducción de apoptosis por agentes citotóxicos y radioterapia. Sin duda, uno de los desafíos mas grandes es desarrollar tratamientos específicos para erradicar a las CTC, lo cuál es complicado debido a que es necesario caracterizarlas y a su vez diferenciarlas de las células troncales normales. [9].

El concepto de CTC puede variar en diferentes contextos. Por ejemplo, la CTC puede ser la fuente de todas las células malignas en un tumor primario, pueden formar el pequeño reservorio de las CTC inducidas por el tratamiento con quimioterapia (CTC quimioresistentes) que son responsables de la remisión de la enfermedad, o también pueden migrar a otros lugares y dar origen a la metástasis [28] (Figura 9).



**Figura 9. Escenarios que implican células troncales cancerosas. A) Primero ocurren cambios genéticos y epigenéticos en una célula troncal “normal” o en células progenitoras que puedan originar una CTC, la cuál generará un tumor primario. B) Durante el tratamiento con quimioterapia, la mayoría de células de un tumor primario son destruidas, pero si la CTC no es erradicada, el tumor se regenera. C) La CTC originaria de un tumor primario puede migrar a distintos sitios y crear lesiones metastásicas [28].**

La primera evidencia de la existencia de las CTC se obtuvo de los estudios de Lapidot y cols. en 1994. Ellos 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 citosinas específicas y así generan un patrón de diseminación de células con morfología leucémica semejante al encontrado en pacientes. La separación de estas células se realizó con base en la expresión de marcadores de superficie (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) [31].

### 1.6.1 Aislamiento prospectivo de CTC de tumores sólidos

Diferentes poblaciones de células tumorigénicas han sido identificadas en tumores sólidos tales como cerebro [32], próstata [33], colon [34-36], cabeza y cuello [37], páncreas [37-39], hígado [40] y melanoma [41].

Además del empleo de antígenos de superficie para el aislamiento de células tumorigénicas, otras estrategias metodológicas han sido ampliamente utilizadas [42]. Una de ellas, como enfoque alternativo, es la 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 (EGF, por sus siglas en inglés). Estas células, cultivadas como esferas no adherentes, expresaban una proteína encontrada en células troncales neuroepiteliales [43]. A la fecha, varios modelos tumorales han sido evaluados por su capacidad de generar esferas enriquecidas en células tumorigénicas, algunos de ellos son mama [44-45], piel [46], ovario [47] y próstata [48], ver Figura 10.

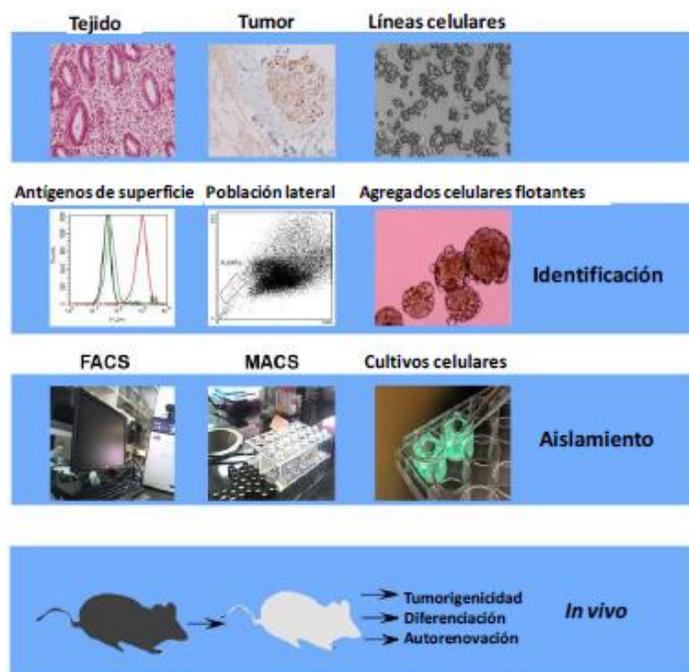


Figura 10. Estrategias comúnmente empleadas para la identificación y aislamiento de células tumorigénicas [López 2012, 49].

### 1.6.2 Implicaciones de las CTCs en tumores sólidos

La identificación de las CTC tiene muchas implicaciones terapéuticas importantes, ya que como se ha mencionado, estas células han desarrollado mecanismos altamente efectivos de resistencia a apoptosis y sobre-expresan proteínas transportadoras involucradas en la quimio-resistencia. Desarrollar blancos terapéuticos que sean selectivamente tóxicos a las CTC puede dar como resultado opciones de tratamientos más efectivos. Además, ha habido gran interés en el análisis de microarreglos de tumores con la finalidad de sub-tipificar tumores, desarrollar marcadores de predicción y pronóstico para el tratamiento tumor específico [15, 50].

## 2. JUSTIFICACIÓN

El CaCU es una de las neoplasias de mayor importancia en México ya que, dentro de las enfermedades neoplásicas, es la segunda causa de muerte en la población femenina en nuestro país. Actualmente, todos los tratamientos que existen para estas patologías no son específicos para las células neoplásicas que dan origen a los tumores sino que matan a las células que conforman la masa tumoral y con ello a gran parte de células no malignas de otros tejidos. Actualmente, se ha sugerido que los tumores surgen a partir de una subpoblación minoritaria de células denominadas Células troncales tumorales o CTC, las cuales poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse aberrantemente, por lo que pueden generar los diferentes linajes celulares que componen un tumor. Estas células requieren de un perfil único de expresión de factores de transcripción para poder mantener estas características de troncalidad. Hasta ahora, muchos factores de transcripción claves han sido descritos como esenciales para la identidad de las células troncales embrionarias, incluidos Nanog y Oct4 que son dos proteínas homeodominio, y Sox2 un factor HMG. Puesto que los mecanismos moleculares que determinan las características de troncalidad han sido estudiados fundamentalmente en células hematopoyéticas y algunos tumores sólidos, consideramos interesante iniciar el análisis de expresión de estos reguladores maestros en células derivadas de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), neoplasia que constituye un problema de Salud Pública importante y representa la segunda causa de muerte en Latinoamérica. La teoría de las Células Troncales Cancerosas (CSC) nos ayuda a entender el por qué los tratamientos actuales no son satisfactorios, la enfermedad aún no es curable si no es diagnosticada en etapas tempranas y la recidiva observada después de los tratamientos convencionales. Por estas razones, el aislamiento, análisis y caracterización de células troncales que da origen a cada tipo de cáncer es un paso importante y necesario para avanzar en el tratamiento eficaz de este grupo de enfermedades ya que en la medida en que estas células sean caracterizadas, podremos obtener marcadores de predicción y pronósticos útiles para elaborar un diagnóstico oportuno, así como para realizar el seguimiento que conduzca a la detección de enfermedad residual, para realizar pruebas de eficacia de nuevos medicamentos.

### **3. OBJETIVOS**

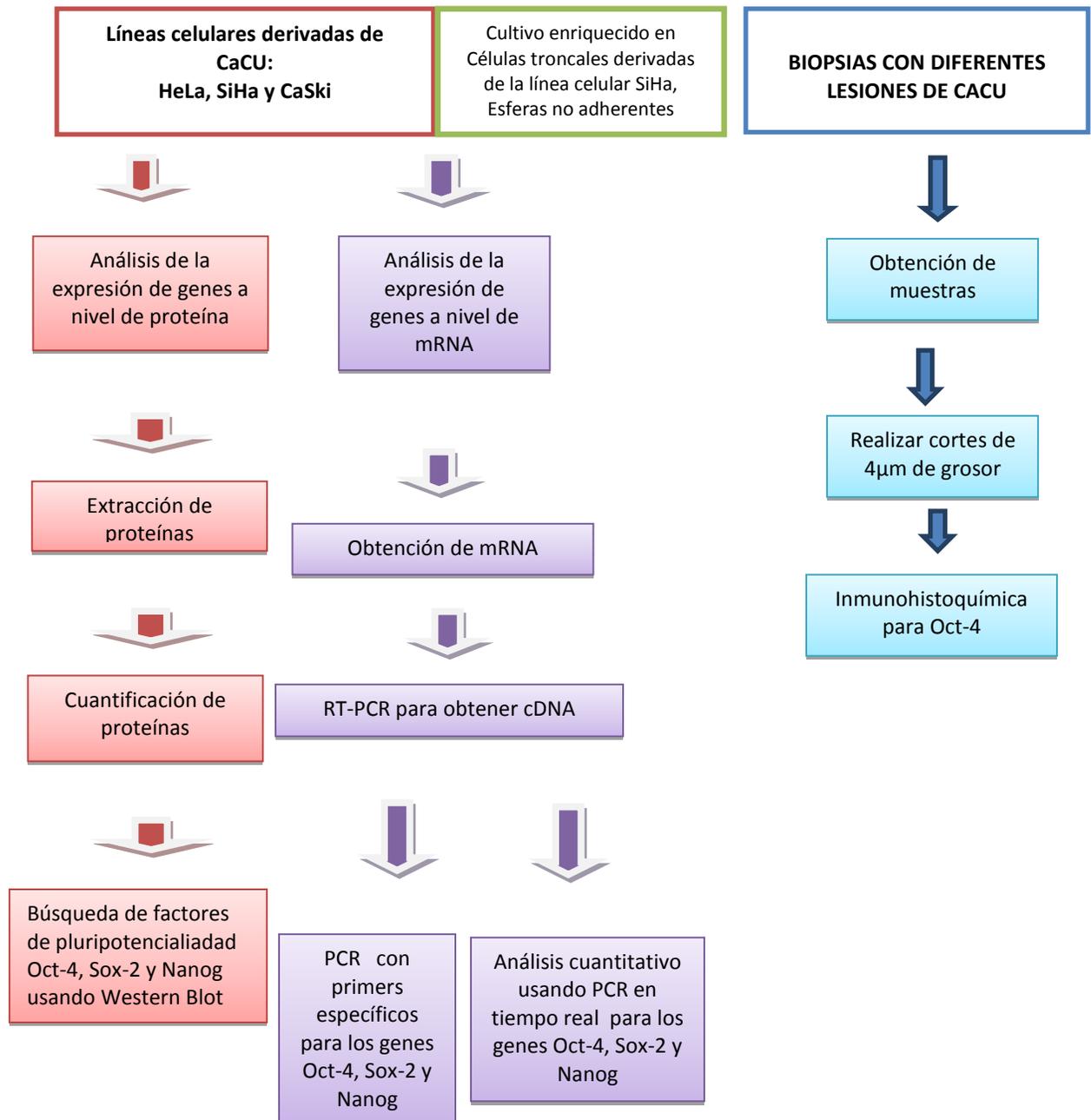
#### **3.1. GENERAL**

Evidenciar, a través de la expresión de los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog, la existencia de una subpoblación de células con características troncales relacionadas con las diferentes etapas de CaCU.

#### **3.2. PARTICULARES**

- Identificar la expresión de los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog en diferentes líneas celulares derivadas de CaCU (SiHa, HeLa y CaSki).
- Identificar la expresión de Oct-4 en Biopias de CaCU con diferente grado de lesión.
- Identificar la expresión diferencial de los genes Oct-4, Sox-2 y NANOG en cultivos enriquecidos en células troncales derivados de la línea celular SiHa.

#### 4. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Cultivo celulares**

Las líneas celulares con las que se trabajó fueron: HeLa, SiHa, CaSki, C33, HaCaT y NCCIT. Las tres líneas derivadas de carcinoma de cuello uterino son: HeLa (VPH18), SiHa (VPH16), Caski (VPH16). NCCIT, la cual fue utilizada como control positivo de expresión, es una línea celular que fue establecida por Shinichi Teshima en 1985 (National Cancer Institute, Tokyo, Japan) a partir de un carcinoma embrionario pluripotente o teratocarcinoma, es capaz de diferenciarse a tejidos somáticos y extraembrionarios mientras que el estado indiferenciado es equivalente a un estado intermedio entre semioma y carcinoma embrionario. La línea celular HaCaT es una línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos. La línea celular NCCIT se cultivó en medio RPMI 1640 (PAA, Pasching, Austria), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Biochrom AG, Berlín, Alemania) y el 1% estreptomina / kanamicina (PAA, Pasching, Austria) y para las otras líneas celulares se usó el medio de cultivo DMEM (PAA, Pasching, Austria), suplementado con SFB al 10% (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y 1% de kanamicina / estreptomina (PAA, Pasching Austria Laboratories). Los cultivos se desarrollaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Las resiembras se realizaron cada dos días cuando el cultivo alcanzaba 50% de confluencia.

### **5.2. RT-PCR**

A partir de los cultivos celulares al 70-80% de confluencia en cajas p100 (7-8 millones de células) se extrae el RNA (TRIzol®). La calidad y la cuantificación del RNA se determinaron usando el equipo Epoch TM Operator's manual de BioTek. El RNA se digirió con DNasa I (BioLabs) y fue usado para la síntesis del cDNA (Super Script III First-Strand Syntesis System, Invitrogen). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo usando oligo (dT) y las condiciones que el fabricante señala. La amplificación del cDNA para la obtención de los transcritos se realizó en muestras con volumen de 25 µL. La reacción de PCR se llevó a cabo durante 40 ciclos y cada ciclo comprendió: desnaturalización, durante 30 segundos a 94°C; alineamiento, 60 segundos a 60°C; y la extensión de 30 segundos a 72°C, con una elongación final de 5 minutos a 72°C. Los pares de primers utilizados fueron los que se muestran en la tabla la Tm para los tres genes es de 60°C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% incluyendo un marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cDNAs de los genes.**

Gen	Secuencia	Tamaño de fragmento amplificado (pb)
<b>GADPH</b>	(F) 5'CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA 3'	305
	(R) 5'GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT 3'	
<b>OCT-4</b>	(F) 5' CTTCGGATTTTCGCCTTCTC 3'	94
	(R) 5'CTTAGCCAGGTCCGAGGAT 3'	
<b>SOX-2</b>	(F) 5' TCGGAGCGCTGCACAT 3'	93
	(R) 5'GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA3'	
<b>NANOG</b>	(F) 5'AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG 3'	148
	(R) 5'TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC 3'	

### 5.3. Western Blot

De un cultivo celular en una caja P100 al 70-90% de confluencia se obtiene el extracto proteico. Las células se lisan usando 200 µL de RIPA (Tris-HCl ph 7.4 50mM, NaCl 150mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, PMSF 100X ) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA-free, Roche) y se sonicán durante 4 a 10s en intervalos de 30s. La cuantificación de proteínas fue determinada usando el Kit de ensayo de proteínas BSA \* \* PIERCE. 50µg de proteínas fueron separados en un gel SDS-PAGE al 10% de acuerdo a los procedimientos estándares y la transferencia se realizó en membranas Amersham™ Hybond™-ECL y lavadas en PBS-Tween. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los distintos anticuerpos primarios (Abcam polyclonal rabbit antibodies Oct-4 ab 18976; Sox-2 ab 59776; Nanog ab 21624). Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween e incubadas con el Ab secundario goat-anti-rabbit. Para la detección del complejo Proteína-Ab se utilizó el kit de Quimioluminiscencia ECL (ECL Western Blotting detection reagents and analysis system, Amersham™) aplicándolo a las membranas de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

### 5.4. RT-qPCR

A partir de cultivos celulares en cajas p100 de SiHa, esferas de SiHa, NCCIT y HaCaT al 70-80% de confluencia (7-8 millones de células) se extrae el RNA (TRIzol®). La calidad y la cuantificación del RNA se determinaron usando el equipo Epoch™ Operator's manual de BioTek. El RNA se digirió con DNasa I (BioLabs) y fue usado para la síntesis del cDNA (Super Script III First-Strand Synthesis System, Invitrogen). La reacción de RT-qPCR se realizó adicionando cDNA 500 ng/µl,

BYBR 10  $\mu$ L, Oligos 1  $\mu$ l (100ng/ $\mu$ g y agua para obtener un volumen final de 20  $\mu$ l). Se utilizó Real-Time StatMiner™ Software para obtener los resultados y el análisis estadístico se realizó por el método de -2 delta delta CT.

### 5.5. Obtención y selección de muestras clínicas de CaCu

A partir de 18 biopsias de cuello uterino (3 Sin lesión, 3 NIC-I, 3 NIC-II, 3 NIC-III, 3 Cáncer in Situ y 3 Cáncer Invasor) , obtenidas y diagnosticadas por un patólogo del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Cancerología, previamente fijadas, deshidratadas y embebidas en parafina se realizaron cortes de 4 $\mu$ m de grosor con un micrótomo Leica que se extendieron y fijaron sobre portaobjetos cargados eléctricamente (Kling-om HIER Slides, Biocare Medical) en baño de agua para tejidos Lab-Line Instruments que contenía una solución con grenetina.

### 5.6. Inmunohistoquímica

Para la técnica de inmunohistoquímica se utilizó el Kit Comercial ***Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB Detection System*** con algunas modificaciones descritas a continuación:

Se desparafinaron los cortes en un horno a 59°C toda la noche. Transcurrido este tiempo se colocaron 20min en Xilol (dos cambios) para después ser rehidratados gradualmente 5 min en etanol (100%, 70% y 50% respectivamente), posteriormente fueron lavados 2min con TBS 1x y transferidos al Buffer comercial de Citratos *ImmunoRetriever Citrate* y colocados en una olla de presión durante 11 min. Una vez terminado este proceso se lavan dos veces durante 5min en TBS plus (TBS 1% con 0.025% Tritón X-100) y se delimita el tejido con silicón para posteriormente bloquear regiones no específicas con suero normal de cabra 1% BSA durante 1h. Terminado el bloqueo se coloca el anticuerpo primario Oct-4 (Santa Cruz sc-5279) diluido 1:100 en TBS con 1% BSA y se incuba durante dos días a 4°C en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se realizan dos lavados de 5min con TBS plus para a continuación inactivar las peroxidases endógenas incubando 3min con la solución comercial *PolyDetector Peroxidase Blocker*. En seguida se lava 1min con TBS 1X y se coloca *PolyDetector HRP Label* 45 minutos. Transcurrido este tiempo se lavan las laminillas 3 veces durante 5m en TBS 1X, tiempo en que debe prepararse la solución cromogénica DAB (495 $\mu$ L DAB Buffer: 5 $\mu$ L DAB). En seguida se adiciona la solución cromogénica durante 10min o hasta obtener señal. Una vez terminado el proceso anterior se lavan las muestras 3min en TBS 1X y se contratiñen con hematoxilina 10s, se lavan con agua corriente hasta virar el color, con TBS 1X por 30s y con agua destilada dos veces durante 1min en cada cambio. Finalmente se dejan secar, se les aplica medio de pre-montaje para ser montadas con resina sintética para su preservación.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis *in silico* para el diseño de oligonucleótidos, extracción de RNA y obtención de cDNA

Para el diseño de los oligonucleótidos o primers que amplificaran los productos de interés, se utilizó un software de Applied Biosystems (qRT Priprimers) el cual ofrece la ventaja de generar oligonucleótidos específicos para regiones del gen de interés, en este caso esto fue fundamental ya que Oct-4 presenta Splicing Alternativo [51], generando diversas isoformas (OCT4A, OCT4B, OCT4B1) que tienen un papel funcional diferente, siendo OCT4A la isoforma de interés ya que ésta tiene un rol crítico en el desarrollo embrionario en relación con el mantenimiento del estado pluripotente [52], de ahí la importancia de centrarnos en una región específica para esta isoforma, ver figura 11. En la primera parte del estudio se realizó un análisis *in silico* de los 6 pseudogenes de Oct-4 para eliminar la posibilidad de estar amplificando algunos que no fueran funcionales [53].

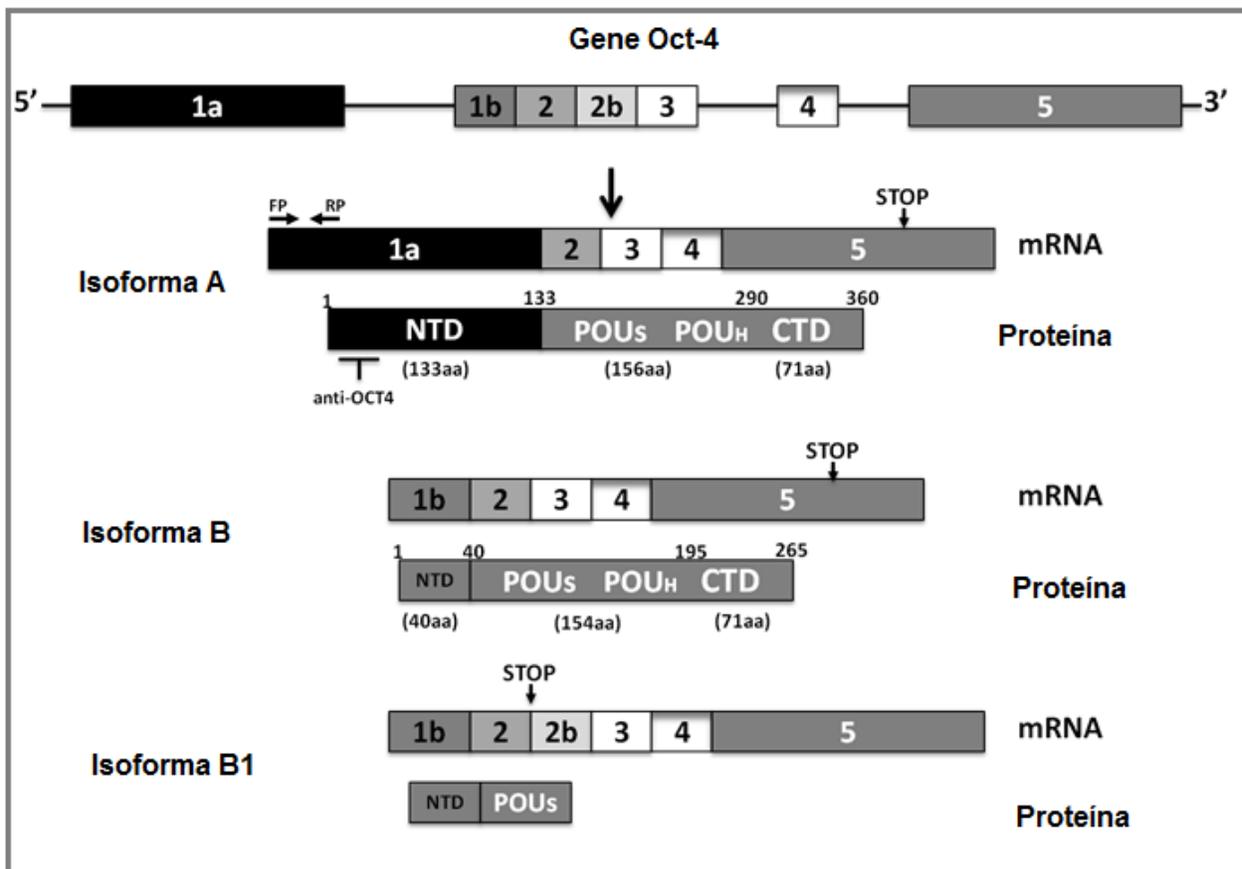


Figura 11. Estructura esquemática del gene humano de Oct-4. Tres Isoformas de Oct-4 son generadas por Splicing alternativo. Se muestra la región de reconocimiento de los oligonucleótidos específicos y el sitio de unión de los anticuerpos utilizados. POU<sub>S</sub> – POU-dominio específico, POU<sub>H</sub> – POU homeodominio, NTD – N-dominio de transactivación, CTD – C-domino de transactivación, FP- oligonucleótido directo, RP- oligonucleótido reverso. Imagen modificada de la publicación original de Xia Wang [51].

Los cultivos se cosecharon a la cuarta resiembra para realizar la extracción del RNA total de diferentes líneas celulares ( HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT, NCCIT), el cual se extrajo y se sometió a digestión con DNasa para ser purificado. Figura 12 A.

Una vez purificado el RNA se realizó la retrotranscripción para la obtención de cDNA. Para comprobar la integridad del cDNA extraído se procedió a hacer una PCR para el gen constitutivo GADPH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) utilizando los oligonucleótidos correspondientes, lo cuales amplifican un producto de 305 pb (Figura 12 B).

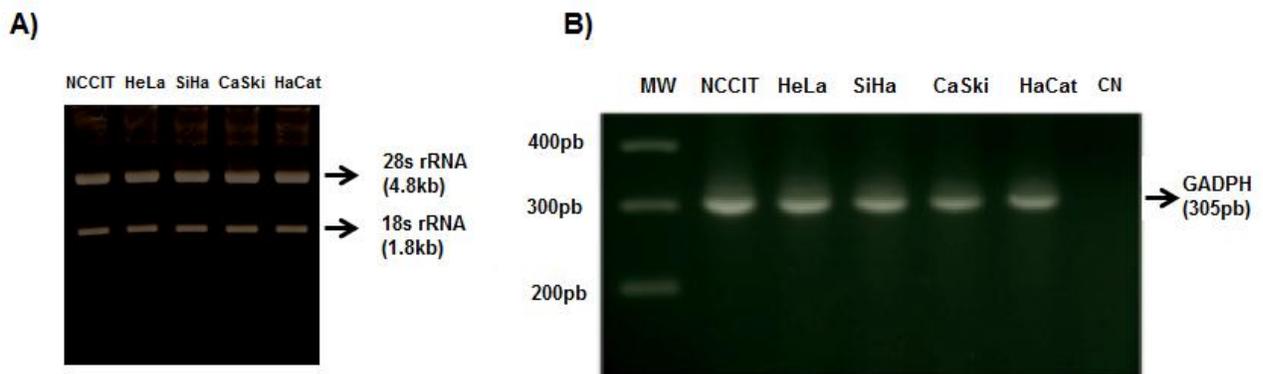
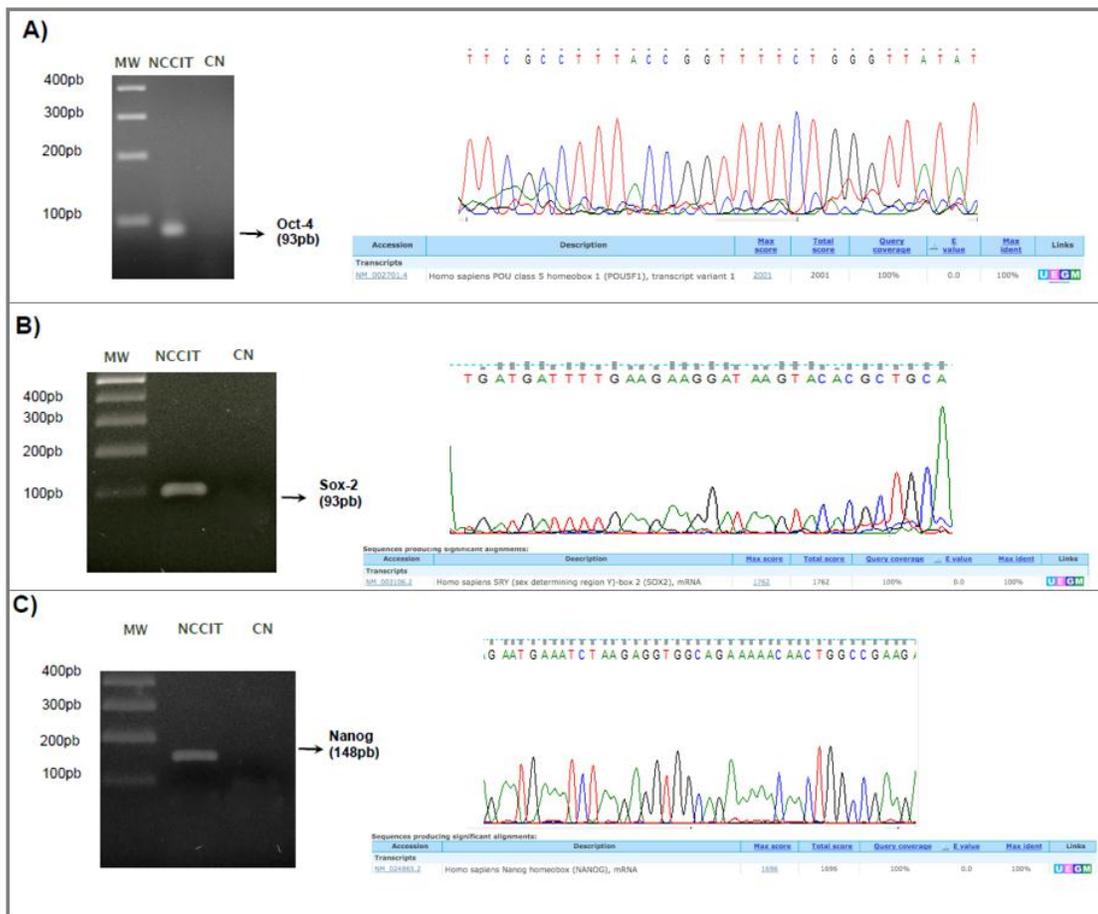


Figura 12. RNA extraído y cDNA obtenido por RT-PCR. A) RNA extraído y purificado. Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 al 4 RNA purificado de Teratocarcinoma (NCCIT), HeLa, SiHa, CaSki y HaCaT respectivamente) B) RT-PCR del gen constitutivo GADPH en líneas celulares derivadas de CaCU para evaluar la integridad del cDNA. Gel de agarosa al 1.5%, carril 1 marcador de PM, carriles 2 al 6 GAPDH en cDNA de NCCIT, HeLa, SiHa, CaSki y HaCaT respectivamente; carril 7, control sin cDNA.

## 6.2. Análisis de la expresión de los mensajeros de Oct-4, Sox-2 y Nanog en teratocarcinoma (NCCIT).

Los oligonucleótidos diseñados para los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog se probaron en la línea celular NCCIT para evaluar si esta línea celular era un buen control positivo. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para la amplificación de los tres genes en la línea celular NCCIT y como puede observarse hay expresión del mensajero en los tres casos, lo cual indica que esta línea celular es un buen control de expresión para estos factores de transcripción. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 93pb para Oct-4, 93pb para Sox-2 y 148pb para Nanog.



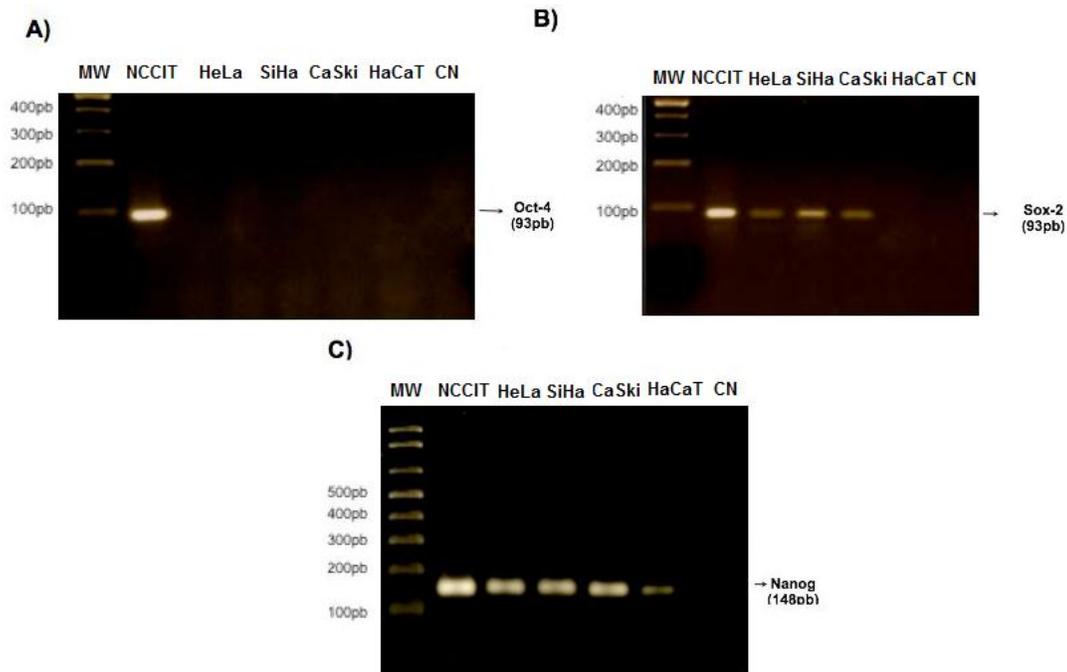
**Figura 13.** RT-PCR de Oct-4 (A), Sox-2 (B) y Nanog (C) en la línea celular NCCIT en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb respectivamente; Carril 2: Producto amplificado Oct-4, Sox-2, Nanog respectivamente; Carril 3 Control Negativo sin cDNA respectivamente. A la derecha de cada inciso se muestran los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los productos de la PCR de cada uno de ellos.

Para evidenciar que el transcrito amplificado es específico del gen, se purificó la banda del gel de agarosa y se envió a secuenciar. Los resultados se observan en el lado derecho de cada inciso de la Figura 13, donde las secuencias obtenidas fueron analizadas por Blast y se obtuvieron homologías del 100% para los genes correspondientes por lo que se demostró que el mRNA es específico para cada gen y que la línea celular NCCIT expresa los factores de transcripción relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia y troncalidad Oct-4, Sox-2 y Nanog.

### 6.3. Análisis de la expresión de los mensajeros de Oct-4, Sox-2 y Nanog en las diferentes líneas celulares (NCCIT, HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT)

A continuación se realizó la técnica de PCR para los genes OCT-4, SOX-2 y NANOG con los cDNAs de las diferentes líneas celulares derivadas de CaCU HeLa, SiHa y CaSki para determinar si existe expresión de estos genes a nivel de mensajero. Los resultados, de la Figura 14 muestran

que Oct-4 no se expresa a nivel de mRNA en ninguna de las líneas derivadas de cáncer Cérvico uterino, mientras que para los genes Sox-2 y NANOG sí se observa amplificación y por lo tanto está presente su transcrito en estas líneas celulares.

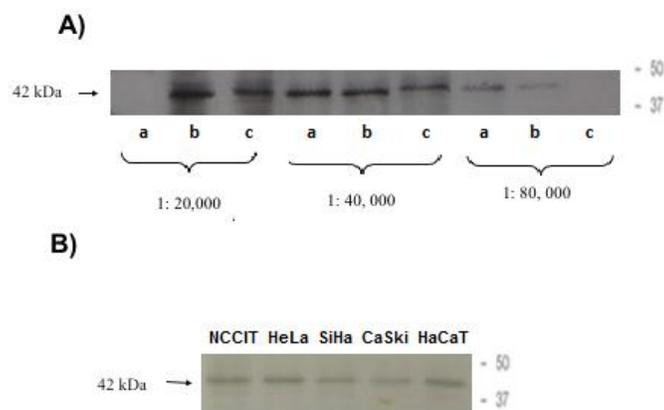


**Figura 14.** A) RT-PCR de Oct-4 (93pb) en la líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT). Carril 1. MW, Carril 2: NCCIT, Carril 3: HeLa, Carril 4: SiHa, Carril 5: CaSki, Carril 6: HaCaT, Carril 7: Control sin cDNA. B) RT-PCR de Sox-2 (93pb) en las líneas celulares que se indican. C) RT-PCR de Nanog (148pb) en las líneas celulares que se indican.

#### 6.4. Análisis de la expresión de $\beta$ Actina en las líneas celulares NCCIT, HeLa, SiHa, CaSki, HaCaT.

Para analizar la expresión a nivel de proteína de los genes estudiados, se realizó la técnica de Western Blot. Para su estandarización se usó el anticuerpo primario anti  $\beta$  Actina, como control positivo de expresión proteica de un gen constitutivo.

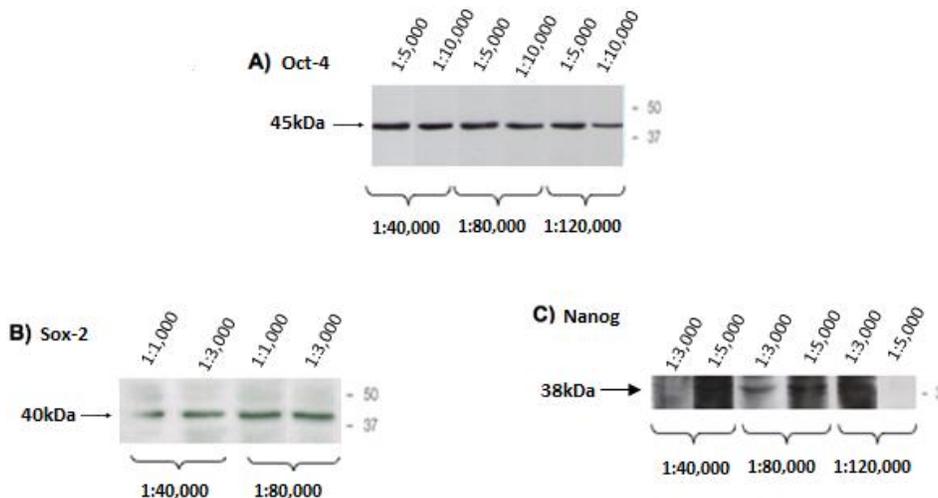
Se variaron las concentraciones de los anticuerpos, primario y secundario, y se colocaron 50 $\mu$ g de proteínas del lisado de células HeLa, por carril. Las concentraciones usadas fueron: 1:5,000, B.1:10,000 y C. 1:20,000 para el Anticuerpo primario y para el secundario 1:20,000, 1:40,000 y 1:80,000, como se muestra en la Figura 15 A. Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron las concentraciones 1:10,000 para el anticuerpo primario y 1:40,000 para el anticuerpo secundario para realizar la técnica en los demás extractos celulares, los resultados se muestran en la Figura 15 B.



**Figura 15. Western Blot con el anticuerpo primario contra Actina**  
**A)** Distintas concentraciones tanto para el anticuerpo primario (a 1:5,000, b.1:10,000 y c. 1: 20,000) como para el secundario (1:20,000, 1:40,000 y 1: 80,000). **B)** Concentración óptima 1:10,000 para el anticuerpo primario y 1:40, 000 para el anticuerpo secundario en las líneas celulares NCCIT, HeLa, SiHa, CaSki y HaCaT.

### 6.5. Análisis de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog en la línea celular NCCIT.

Al trabajar con los anticuerpos de interés, se realizaron diferentes diluciones para establecer las concentraciones adecuadas de anticuerpos primarios y secundarios. En los tres casos se colocaron 50µg de extracto de proteínas de línea celular NCCIT, los resultados se muestran en la Figura 16.



**Figura 16. Estandarización de Western Blot usando los anticuerpos contra Oct-4, Sox-2 y Nanog en la línea celular NCCIT.** **A)** Expresión de Oct- 4 (45kDa) usando el anticuerpo anti Oct-4 a concentraciones 1:5,000 y 1:10,000, usando el anticuerpo secundario (1:40,000 1: 80,000 y 1:120,000). **B)** Expresión de Sox2 (40kDa) usando el anticuerpo primario Anti- Sox2 a las diferentes concentraciones 1:1000 y 1:3000 ; y el secundario a 1:40,000 y 1:80,000. **C)** Expresión de Nanog (38kDa) usando el anticuerpo contra Nanog (ab 18976-100) a diferentes concentraciones (1:3000, 1:5000) y el secundario a 1:40,000, 1:80,000 y 1:20,000.

En estos resultados se determinó que la concentración óptima en Oct-4 fue 1:10,000 para el anticuerpo anti- Oct4 y 1:80,000 del anticuerpo secundario. En Sox-2 las mejores condiciones fueron para el anticuerpo primario (1:1,000) y el secundario a 1:80,000. Para Nanog la dilución óptima del primario es 1:3,000 y el secundario 1:80,000.

### 6.6. Análisis de las proteínas Oct-4, Sox-2 y Nanog en las diferentes líneas derivadas de CaCu ( HeLa, SiHa, CaSki), NCCIT y HaCaT.

Una vez establecidas las diluciones para los anticuerpos, se realizó la técnica de Western Blot en las diferentes líneas celulares. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 17.

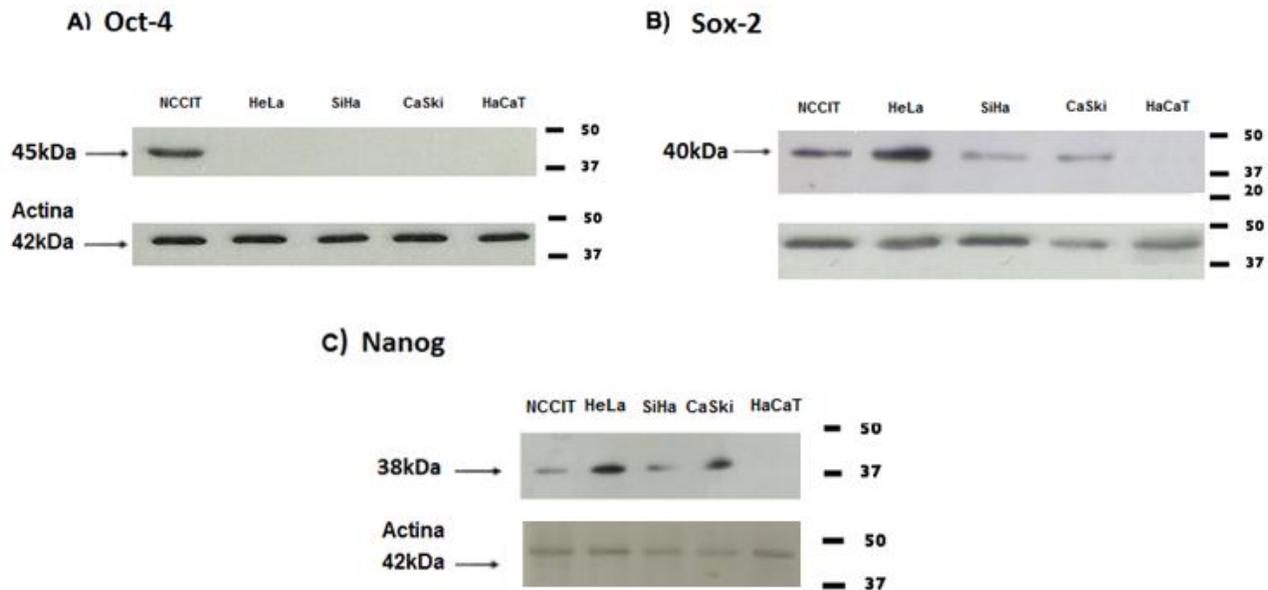
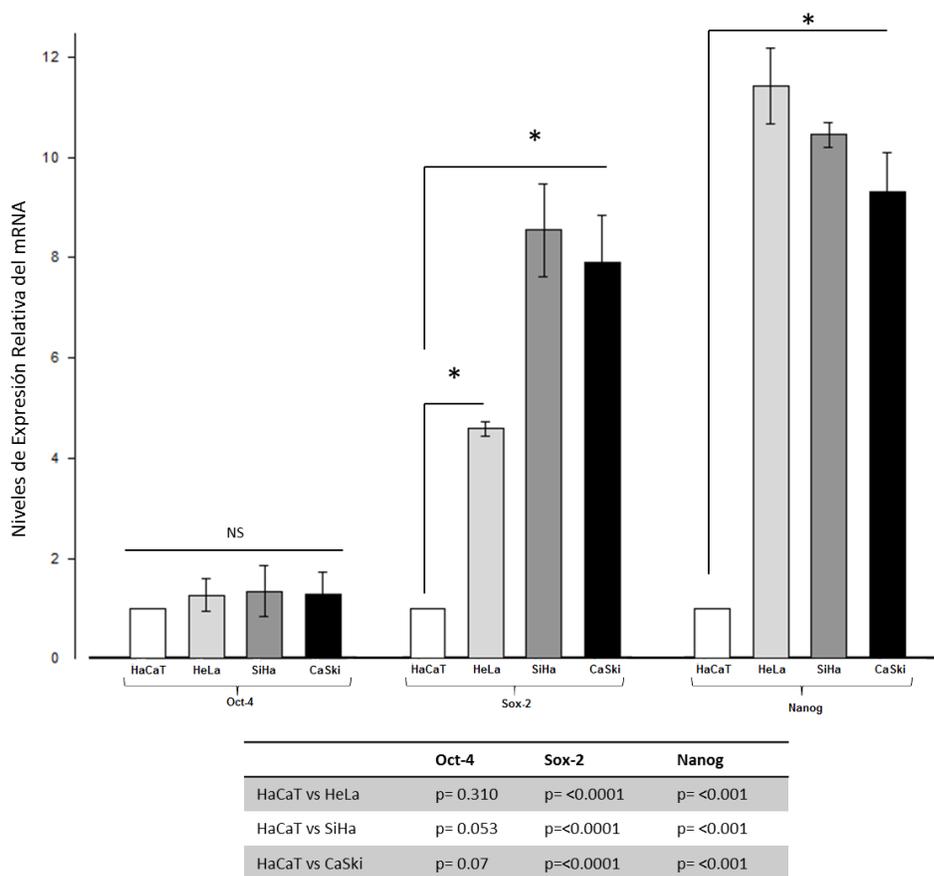


Figura 17. Western Blot para Oct-4, Sox-2 y Nanog en diferentes líneas celulares derivadas de CaCU (HeLa, SiHa y CaSki), NCCIT y HaCaT. A) Usando el anticuerpo contra Oct-4, B) Usando el anticuerpo contra Sox-2, C) Usando el anticuerpo anti-Nanog. Se usó en anticuerpo anti  $\beta$  Actina como control.

Los resultados muestran, en concordancia con los resultados obtenidos para el análisis de la expresión a nivel de mRNA mostrado anteriormente, que existe expresión a nivel de proteína para los genes Sox-2 y Nanog en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki, mientras que para el gen Oct-4 no se observa señal.

### 6.7. Análisis cuantitativo de la expresión relativa de Oct-4, Sox-2 y Nanog usando RT-qPCR en las diferentes líneas derivadas de CaCu ( HeLa, SiHa, CaSki), NCCIT y HaCaT.

Por medio de una RT-qPCR se analizó la expresión relativa de los mensajeros de Oct4, Sox-2 y Nanog en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki, usando como control negativo a la línea celular HaCaT. Se extrajo y purificó el mRNA, posteriormente se realizó la retrotranscripción utilizando las condiciones estandarizadas. Los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado y los valores se expresan como promedio + SEM (normalizado con B2M) y fueron analizados estadísticamente usando t-est  $p < 0.001$ . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18 y en concordancia con los resultados anteriores, se observa que la expresión relativa de Oct-4 no es estadísticamente significativa en ninguna de las líneas celulares mientras que la expresión de los genes Sox-2 y Nanog aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ).



**Figura 18.** Cuantificación de la expresión de los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog por RT qPCR en las líneas celulares derivadas de Cáncer Cérvico Uterino HeLa, SiHa y CaSki, todas comparadas con la expresión en HaCaT como control negativo. Los experimentos de RT-qPCR se realizaron por triplicado y los valores se expresan como promedio  $\pm$  SE (normalizado con B2M). NS, no significativo. \* indica estadísticamente significativo usando t-est  $p < 0.001$ .

### 6.8. Análisis cuantitativo de la expresión relativa de Oct-4, Sox-2 y Nanog en poblaciones enriquecidas (Esferas) derivadas de la línea celular SiHa.

El aislamiento, la formación y caracterización de poblaciones enriquecidas en CTC, como esferas no adherentes, derivadas de la línea celular SiHa se realizó en el laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología por la Dra. Jacqueline López [49]. Estas poblaciones fueron enriquecidas en medios selectivos como agregados celulares no adherentes (Esferas no adherentes), positivos para el antígeno de superficie CD49f. Además se realizó un estudio de tumorigenicidad *in vivo* y se evidenció que  $1 \times 10^3$  células derivadas de esferas generaron tumores en ratones nu-nu mientras que  $1 \times 10^5$  células de monocapa no produjeron tumor. Las poblaciones celulares aisladas fueron transplantadas de manera seriada, generando tumores compuestos por células que recapitulaban la diversidad fenotípica de los tumores primarios generados a partir de la línea celular SiHa. Las poblaciones celulares enriquecidas sobre-expresaron marcadores de células troncales epiteliales y genes asociados a la transición epitelio-mesenquima. De igual manera, se observó aumento en la expresión de los genes involucrados en la reparación de DNA y en el metabolismo de especies reactivas a oxígeno, cambios corroborados funcionalmente *in vivo* al evidenciarse una mayor resistencia de las poblaciones celulares enriquecidas en CTC, ver Figura 19 [51].

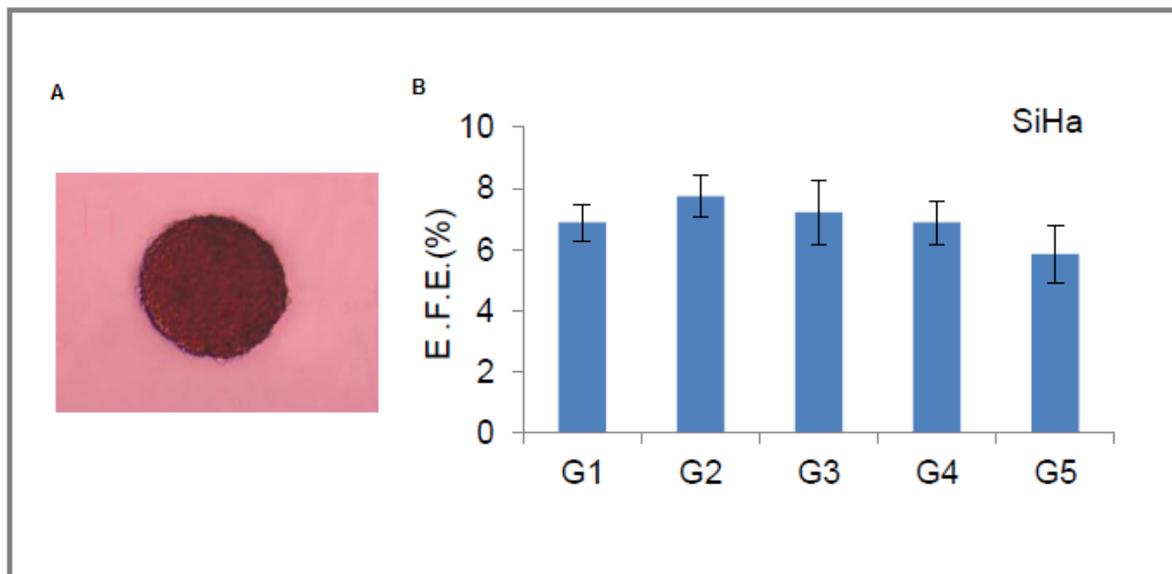
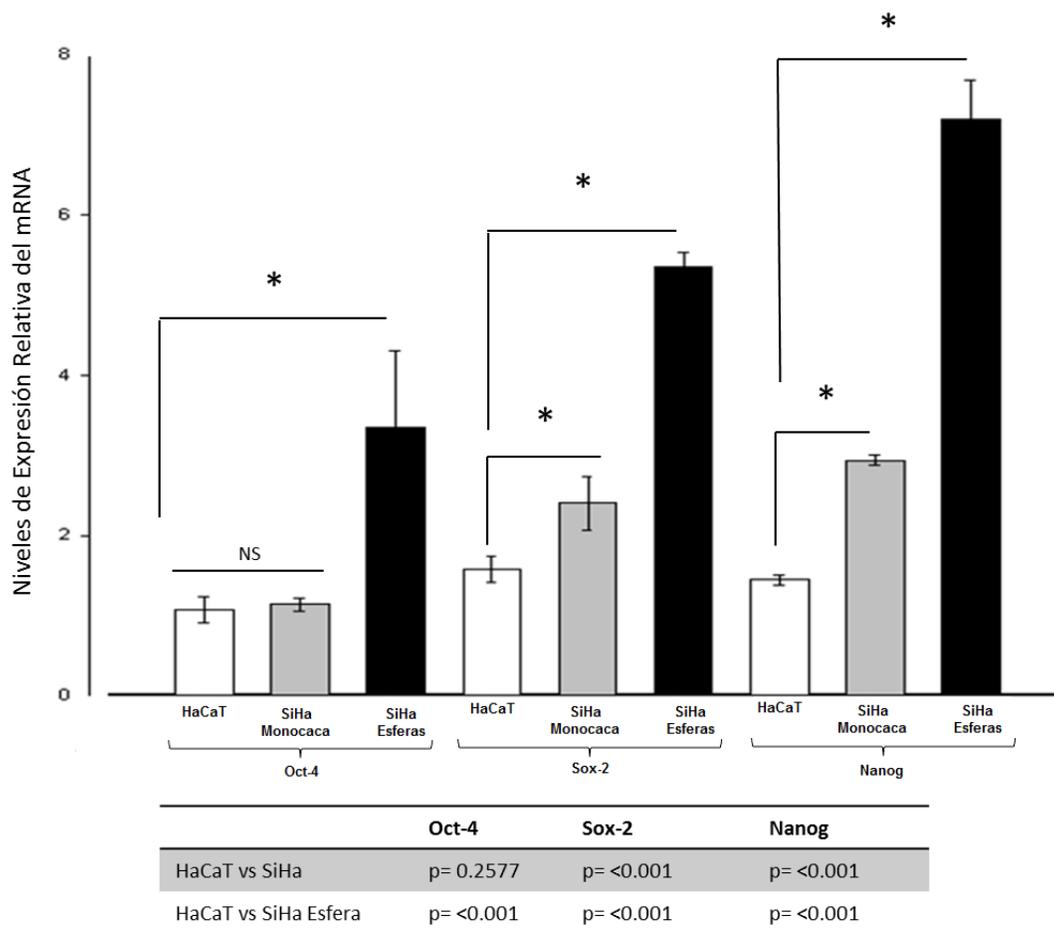


Figura 19. Cultivo de agregados celulares no adherentes derivados de la línea celular SiHa, y medida de su capacidad de autorrenovación *in vitro*. A, morfología de células cultivadas en condiciones independientes de anclaje como agregados celulares no adherentes una semana después de la siembra, aumento 10x. B, 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 100células/pozo en 200 $\mu$ L de medio libre de suero, 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. Modificado de la publicación original de Jacqueline López [49].

Dado que en los ensayos anteriores se trabajó con cultivos celulares homogéneos y no se logró encontrar ningún indicio de la expresión de Oct-4 optamos por trabajar con poblaciones enriquecidas en CTC, como esferas no adherentes, derivadas de la línea celular SiHa [49] para determinar si en estas poblaciones aumenta la expresión tanto de Oct-4 como de Sox-2 y Nanog. Por medio de una RT-qPCR se analizó la expresión de los mensajeros de Oct-4, Sox-2 y Nanog en una población enriquecida derivada de la línea celular SiHa. Los resultados se muestran en la Figura 20 y se observa que en esta población de células enriquecidas la expresión de Oct-4 aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ), al igual que la de Nanog y Sox-2.

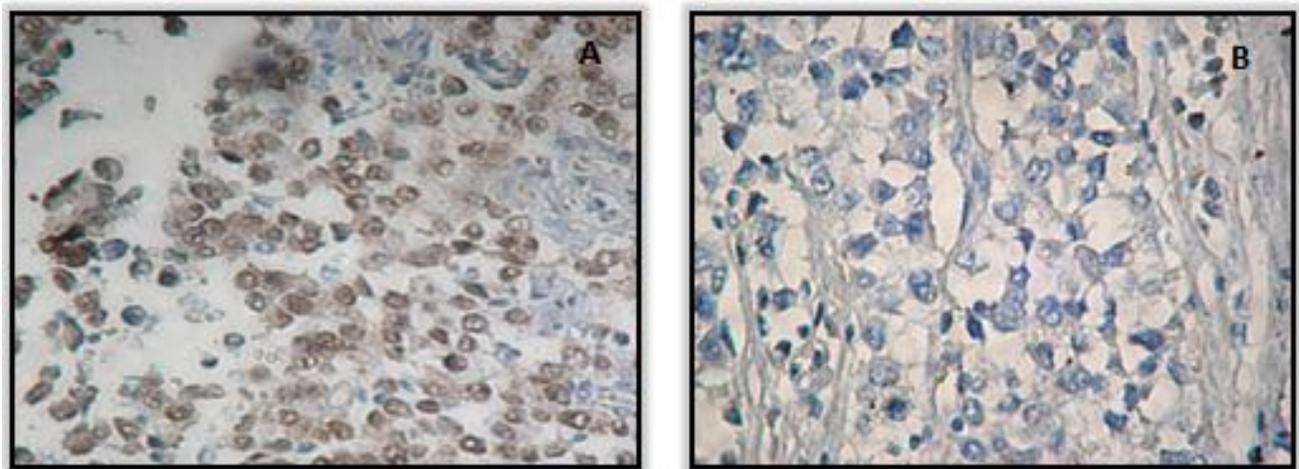


**Figura 20.** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de Oct-4, Sox-2 y Nanog en poblaciones enriquecidas derivadas de la línea celular SiHa contra monocapa de SiHa, comparadas con la expresión en HaCaT como control negativo. Los experimentos de qRT-PCR se realizaron por triplicado y los valores se expresan como promedio  $\pm$  SE (normalizado con B2M). NS, no significativo. \* indica estadísticamente significativo usando t-est  $p < 0.001$ .

### **6.9. Evaluación de la expresión de la proteína OCT-4 por Inmunohistoquímica en cortes histológicos de Disgerminoma de Ovario.**

La siguiente estrategia sugerida fue analizar la expresión de Oct-4 a nivel de proteína, pero como no se contaba con el material biológico suficiente para realizar su búsqueda en los cultivos enriquecidos usando Western Blot, se optó por realizar Inmunohistoquímicas en biopsias de cérvix sin lesión, con diferentes grados de lesión y carcinomas cérvicouterinos con el fin de asociar los niveles de expresión de Oct-4 con los cambios epiteliales.

Para ello se realizaron ensayos de Inmunohistoquímica, con la intención de localizar la expresión de la proteína de interés, ya que esta técnica permite observar su localización celular [23]. Para estandarizar las condiciones de la Inmunohistoquímica se trabajó en un corte de Disgerminoma de Ovario usando un anticuerpo anti Oct-4 diluido 1:100. Los resultados se observan en la Figura 21.



**Figura 21. A) Inmunodetección de Oct-4 usando un anticuerpo específico para la isoforma OCT4A en disgerminoma de Ovario usando el anticuerpo primario diluido 1:100. B) Control negativo, sin anticuerpo primario. Aumento 400x.**

### **6.10. Evaluación de la expresión de la proteína Oct-4 por Inmunohistoquímica en biopsias de cérvix con diferentes lesiones.**

Los ensayos se realizaron en biopsias de cérvix sin lesión, con lesiones premalignas y carcinomas. Los resultados se muestran en la Figura 22, en la cual puede observarse que existe expresión de la proteína Oct-4 en todos los tipos de lesión (desde NIC I hasta Cáncer Invasor) y en cáncer invasor un gran número de células la expresan.

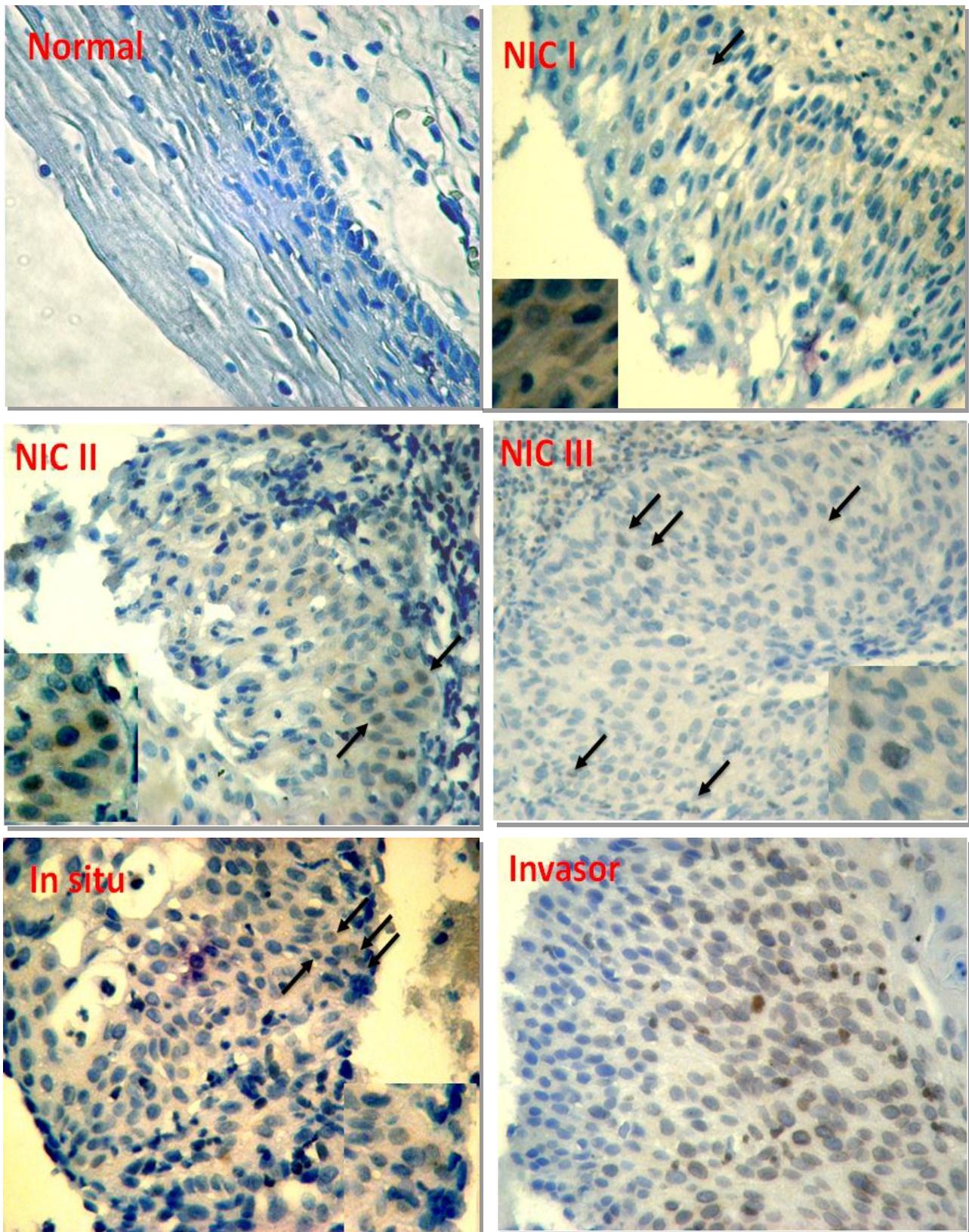


Figura 22. Inmunodetección de Oct-4 usando un anticuerpo específico para la isoforma OCT4A en biopsias de cérvix. Con flechas se indican las células con señal positiva y en los recuadros una ampliación de las mismas. Aumento 400x.

## 8. DISCUSIÓN

Recientemente, algunos estudios han evidenciado la existencia de poblaciones celulares tumorigénicas con propiedades biológicas de células troncales. Esta teoría de las Células Troncales Cancerosas sugiere que los tumores surgen a partir una subpoblación minoritaria de células denominadas células troncales cancerosas (CTC, Cancer Stem Cells), las cuales poseen las siguientes características principales: capacidad de autorrenovación, capacidad de diferenciación aberrante, muchas de ellas se encuentran en estado quiescente, expresan proteínas asociadas con el eflujo de drogas y son resistentes a la inducción de apoptosis por agentes citotóxicos y radiaciones [54-55]. Este nuevo concepto ha cambiado la comprensión sobre el desarrollo y progresión de los tumores ya que además, éstas células han sido propuestas como las responsables del proceso de metástasis, recidiva, y resistencia a quimio y radioterapia, por lo que se esta promoviendo su estudio para el diseño y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico.

Las CTC poseen un perfil único de expresión de factores de transcripción para poder mantener sus características de troncalidad. Los factores de transcripción reconocidos hasta el momento como esenciales para la identidad de las células troncales embrionarias son: Nanog y Oct-4 (proteínas homeodominio) y Sox-2 (factor HMG). En estudios previos realizados en tumores sólidos, se ha demostrado que estos factores se encuentran presentes sólo en una población minoritaria de células de la masa tumoral, razón por la cual resultaba interesante determinar si en el caso de CaCU esta subpoblación también se encuentra presente. La estrategia realizada para abordar el problema fue analizar la expresión genética a nivel de mensajero y de proteína de los genes Oct-4, Sox-2 y Nanog, que se sabe forman una red autóloga y están involucrados en el proceso de autorrenovación de las células troncales. Este estudio se llevó a cabo en cultivos de líneas celulares derivadas de Cáncer Cérvico Uterino (HeLa, SiHa y CaSki), en poblaciones enriquecidas en CTC, como esferas no adherentes, derivadas de la línea celular SiHa [49] y en biopsias de cuello uterino sin lesión, lesiones precursoras y algunos tipos de Carcinomas (*in situ* e invasor).

Oct-4 es un marcador por excelencia de las células troncales embrionarias ya que se sabe que está asociado con el mantenimiento de la pluripotencia. Sin embargo, recientemente se ha reportado que Oct-4 se expresa en células somáticas adultas [56] y en células tumorales de diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama [57], cáncer de vejiga [58], displasia de tejido epitelial [59] y pulmón [60]. La estrategia metodológica utilizada en este trabajo, no nos permitió detectar la presencia de Oct-4 a través de su transcrito ni de su proteína en las líneas celulares

HeLa, SiHa y CaSki; resultados que concuerdan con lo reportado por Cantz y cols. donde la expresión de esta proteína tampoco fue identificada en la línea celular HeLa empleando técnicas de inmunofluorescencia, PCR y Western Blot, argumentando que estos resultados podrían atribuirse a que la región promotora de Oct-4 se encuentra altamente metilada y sugiriendo que los reportes de la expresión de Oct-4 en líneas celulares de CaCU podrían atribuirse a la expresión de un pseudogen o isoformas no relacionadas con el proceso de troncalidad [61]. Es importante señalar que en ningún estudio previo se había realizado el análisis del transcrito del gen Oct-4 en las líneas celulares CaSki ni SiHa, infectadas por el Virus de Papiloma Humano VPH 16, a diferencia de HeLa que contiene VPH 18, lo cual nos lleva a sugerir que la ausencia de expresión de Oct-4 es independiente del tipo de VPH con que esté infectada la línea. Es importante hacer notar que para esta parte de la investigación fue crítica la amplificación de la Isoforma A de Oct-4, ya que Oct-4 presenta Splicing Alternativo [51], generando diversas isoformas (Oct-4 A, Oct-4 B, Oct-4 B1) que tienen un papel funcional diferente. Oct-4 A es la isoforma de interés puesto que tiene un rol crítico en el mantenimiento del estado pluripotente [52] aunado a que se han reportado 6 pseudogenes de ésta isoforma [53]. En este trabajo se mandó secuenciar el producto amplificado (Figura 13) para eliminar la posibilidad de error en la amplificación, ya que otros trabajos donde se han reportado cambios en la expresión de Oct-4 en células somáticas adultas no tomaron en cuenta la presencia de pseudogenes de Oct-4 [61-63]. El análisis de la secuencia mostró una homología del 100%.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki, analizadas en este trabajo, existe expresión de Nanog, otro factor de transcripción regulador de la troncalidad. Esto resulta interesante ya que se tienen reportes que indican que Oct-4 regula la expresión de Nanog a nivel de promotor [64-66], aunque el mecanismo de regulación de este gen se conoce poco. Fue por ello que resultaba indispensable investigar si existía correlación entre la expresión de ambos genes en estas líneas celulares. Interesantemente nuestros resultados sugieren que aunque aparentemente no hay expresión de Oct-4, sí existe el transcrito de Nanog y además aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ) su expresión relativa cuando se analiza usando qPCR en las tres líneas celulares (Figuras 14C y 18), lo cual concuerda con lo encontrado a nivel de proteína (Figura 17C). Esto nos llevó a pensar que debido a que sólo algunas células (<10% de la población total) dentro del cultivo celular estarían expresando Oct-4, su expresión sería mínima como para observar señal por los métodos utilizados.

Además, también se sabe que Sox-2 está involucrado en el proceso de autorrenovación y el proceso de diferenciación [67], pero que también tiene una regulación autóloga con Oct-4 y Nanog, ya que forma un heterodímero con Oct-4 [68]. En el análisis realizado en este trabajo encontramos

que la expresión de Sox-2 es similar a lo hallado para Nanog, tanto para el transcrito (Figuras 14B y 18) como para la proteína (Figura 17B) en las tres líneas celulares derivadas de Cáncer Cérvico Uterino. Estos hallazgos coinciden con lo encontrado en cáncer de mamá [69], cáncer de pulmón [70-71] y en pacientes con meningioma [72-73], donde se usó Nanog como marcador molecular en estos tipos de cánceres y se observó un aumento en su expresión.

En un artículo publicado recientemente de nuestro grupo de trabajo, López y cols. [49] desarrollaron la primera caracterización de células tumorigénicas en líneas celulares de CaCU, empleando para tal fin antígenos de superficie, tinción de Hoescht y formación de esferas, entre otros. De acuerdo con los criterios previamente establecidos para identificar a las poblaciones candidatas encontraron poblaciones celulares minoritarias con capacidad de autorrenovación *in vivo* e *in vitro*, con capacidad tumorigénica y con potencial de diferenciación, ver figura 19. En nuestros resultados, mostrados en la Figura 20, encontramos que en este tipo de cultivo enriquecido en células troncales (esferas no adherentes), la expresión relativa para Oct-4 y los otros dos genes aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ), y que en su respectiva monocapa los resultados son similares a lo encontrado en los cultivos previos. Vale la pena señalar que con esta estrategia pudimos detectar la expresión de Oct-4 en la línea celular SiHa, lo que sugiere que la formación de esferas permite la detección de un mayor número de células con características troncales. Estos datos concuerdan con lo hallado para cáncer oral y carcinoma escamoso de alto grado [65], en retinoblastoma [66] y cáncer de mama [57], en donde se analizó la expresión de Oct-4 y Nanog y se detectaron ambos factores. Lo cual sugiere que la expresión de estos tres factores podría estar relacionado con el mantenimiento de la troncalidad en estas poblaciones y por lo tanto estar involucrados en los procesos de autorrenovación y diferenciación para poder regenerar un tumor.

La siguiente estrategia fue analizar la expresión de Oct-4 en las biopsias de cérvix sin lesión, con diferentes grados de lesión y carcinomas cervicales, mediante Inmunohistoquímicas, con el fin de asociar los niveles de expresión de Oct-4 con los cambios malignos. Los resultados pueden verse en la Figura 22 y muestran que todas las lesiones precursoras de CaCU son positivas a Oct-4, que existe asociación entre los niveles de expresión proteica y los cambios epiteliales, siendo significativamente mayores en carcinomas comparado con las lesiones intraepiteliales y negativo para el tejido normal. Además es interesante ver que en las lesiones intraepiteliales de bajo grado, las células positivas se encuentran cercanas al estrato basal, sitio que se sabe es el nicho para las células troncales somáticas de este tejido. Otros estudios realizados por Ye y cols. donde se examinó la expresión de Nanog en lesiones y carcinomas epiteliales Cérvico uterinos y observaron resultados semejantes [74]. Por otro lado, Ji y cols. examinaron la expresión de Sox-2 tanto en

tejidos como en esferas no adherentes derivadas de SiHa y HeLa y encontraron que el gen Sox-2 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 Sox-2, 2) Carcinomas escamosos grado II y III presentaron una intensidad relativamente mayor comparado con carcinomas escamosos grado I, y 3) Sox-2 fue expresado significativamente en las tumoresferas derivadas de carcinomas primarios y rara vez detectada en células diferenciadas [75]. Los resultados publicados por estos autores y los encontrados en este trabajo sugieren que estos tres genes seguramente están implicados en el proceso de carcinogénesis cérvico uterina.

Finalmente, con este trabajo logramos conjuntar la detección de los tres marcadores de pluripotencia por excelencia: Oct-4, Sox-2 y Nanog, los cuales se expresan claramente en la población enriquecida derivada de la formación de esferas no adherentes obtenidas a partir de la línea celular SiHa, algo que hasta el momento no se había reportado para esta neoplasia. Esto hace suponer que la población celular que expresa Oct-4 dentro del cultivo de estas líneas celulares es menor que las que expresan Sox-2 y Nanog, puesto que en poblaciones totales no detectamos Oct-4. Por otro lado, cuando realizamos inmunodetección de Oct-4 en las biopsias, sí observamos expresión de esta proteína en lesiones avanzadas, lo que sugiere que el microambiente esta desempeñando un papel muy importante para el mantenimiento de las CTC.

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ Los cultivos celulares crecidos en monocapa de las líneas derivadas de Cáncer Cérvico Uterino HeLa (VPH18) y SiHa, CaSki (VPH16) expresan los factores de transcripción Sox-2 y Nanog, mientras que no se detecta la expresión de Oct-4 en estas poblaciones celulares.
- ✓ En poblaciones enriquecidas por formación de esferas no adherentes hay un aumento en la expresión relativa del transcrito para los factores relacionados con el mantenimiento de la troncalidad (Oct-4, Sox-2 y Nanog).
- ✓ La expresión de Oct-4 podría estar implicada en la carcinogénesis Cérvico uterina debido a que existe asociación entre la expresión de este factor y los cambios epiteliales que llevan a la malignidad.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Evaluar la expresión de otros factores de troncalidad que podrían estar implicados en la carcinogénesis cervicouterina.
- Realizar los mismos ensayos de este trabajo en cultivos enriquecidos derivados de líneas celulares HeLa y CaSki, así como para las líneas no infectadas por Virus del Papiloma Humano.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. URL. World Health Organization, Health statistics health information systems [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_country/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html)
2. URL. GLOBOCAN 2008. <http://globocan.iarc.fr/>
3. Alonso et al, Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control, 2° edición, *Editorial Panamericana* 2006, México D.F (Texto de referencia).
4. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer, Cervix Cancer Screening. *Handbook of Cancer Prevention* (IARC Press: Lyon) 2005, Vol 10, pp 1-54.
5. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-8.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
7. Dick JE., Stem cell concepts renew cancer research, *Blood* 2008, 112 (13), 4793 -807
8. Dalerba, P., Cho, R.W. and Clarke, M.F., Cancer Stem Cells: Models and Concepts, *Annu. Rev. Med.* 2007, 58: 18.1-18
9. Max S Wicha; Suling Liu; Gabriela Dontu. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer research* 2006; 66(4):1883-90.
10. Bongso A, Fong CY, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cell from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9: 2110-7.
11. Bianco P, Robey PG. Stem cell in tissue engineering. *Nature* 2001; 414: 118-21.
12. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cell. *Nature* 2001; 414: 92-7.
13. Anzaldúa SR, Juárez ML, Villaseñor H, Ríos MC, Cornejo MA, Meraz MA. ¿Qué son las células troncales o células madre? *Vet Mex* 2007; 38: 81-104
14. URL- <http://www.scq.ubc.ca/stem-cell-bioengineering/>
15. Spillane JB & Henderson MA., Cancer Stem Cells: a review, *ANZ J. Surg.* 2007, 77: 464-468.

16. Buitargo William and Roop Dennis R., Oct-4: The Almighty POUripotent Regulator?, *Journal of investigative Dermatology* 2007, 127, 260-262.
17. Chen L, Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* 2008; 17: R23–27.
18. Falkner, F. G. and Zachau, H. G. Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 1984, 310, 71-74.
19. Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J. and Granner, D. K., Structure of the 5 ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 2650-2654.
20. Klemm, J. D. and Pabo, C. O., Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes Dev.* 1996, 10, 27-36.
21. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development.* 2009; 136:2311–2322.
22. Takahashi K. and Yamanaka S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell* 2006, 126; 4: 25: 652-655.
23. Grinnell KL, Baoli Y, Eckert RL, Bickenbach JR, De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *J Invest Dermatol* 2007, 127:372–380
24. Wagner, R.T., and Cooney, A.J. OCT4: less is more. *Cell Res.* 2009 19:527-528.
25. Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; 12:321–329.
26. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahi GM. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66:9339-44.
27. Visvader Jane E. & Lindeman Geoffrey, Cancer Stem Cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nature Reviews|Cancer* 2008, 8: 755-768.
28. Craig T. Jordan, Ph.D., Monica L. Guzman, Ph.D., and Mark Noble, Ph.D., Mechanisms of disease Cancer Stem Cells, *N Engl J Med* 2006; 355:1253-1261

29. Seufferlein, T., Ahn, J., Krndija, D., Lothar, U., Adler, G. and von Wichert, G., Tumor biology and cancer therapy - an evolving relationship. *Cell Commun Signal*. 2009, 7, 19.
30. Vaish, M., Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cell and therapeutic implications. *Mol. Cancer*. 2007, 6, 26
31. 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.
32. Singh SK, Hawking C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain initiating cells. *Nature* 2004; 432:396-401.
33. Collins AT, Berry PA, Hayde C, Stower MJ, Maitland NJ. Perspective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65:10946-51.
34. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.
35. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Guerney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Permiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:10158-63.
36. Rocci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Paschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445:111-5.
37. 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 cells properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:973-978.
38. 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.
39. Hermann PC, Humber 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.
40. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, 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.

41. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, 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.
42. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183:1797-806.
43. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707-10.
44. 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.
45. Dontu G, Abdallah WM, Forley JM, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003; 17:1253-70.
46. 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 cells properties in melanomas. *Cancer Res* 2004;65:9328-37.
47. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68:4311-20.
48. Garraway IP, Sun W, Tran CP, Perner S, Zhang B, Goldstein AS, Haider M, Head SC, 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* 2010:7491-501.
49. Jacqueline López, Adela Poitevin, Veverly Mendoza-Martínez, Carlos Pérez-Plasencia and Alejandro García-Carrancá\*. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 2012, 12:48.
50. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur 1 Min-Hee, Diebel ME., Mark E. Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature, *Cancer Res* 2009; 69: 4.

51. Xia Wang and Jianwu Dai. Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology. *Stem Cells* 2010, 28(5): 885–893.
52. Hansis C, Grifo JA, Krey LC. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 999–1004.
53. Liedtke S, Enczman J, Waclawczyk S, Wernet P, Kogler G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 364–366.
54. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:895–902.
55. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23:7274–82.
56. Zangrossi S, Marabese M, Brogginini M et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 2007; 25(7):1675–1680.
57. Ezeh U, Turek P, Reijo R, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 2255–65.
58. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007;120: 1598 –1602.
59. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005; 121:465–477.
60. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS ONE* 2008; 3:e2637.
61. Cantz T, Key G, Bleidissel M et al. Absence of OCT4 expression in somatic tumor cell lines. *Stem Cells* 2008; 26: 692–697.
62. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1:403– 415.
63. deJongJ, LooijengaLH. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: History and future. *Crit Rev Oncog* 2006; 12:171–203.

64. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24731-7.
65. Chiou SH, Yu CC, Huang CY et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4085–4095.
66. Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis* 2007; 13:823 -32.
67. N.Ivanova, R.Dobrin, R.Luetal., Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference, *Nature* 2006, vol. 442, no. 7102, pp. 533–538, 2006.
68. Botquin V, Hess H, Fuhrmann G et al. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* 1998; 12(13):2073–2090.
69. Chen Y, Shi L, Zhang L et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* 2008; 283:17969–17978.
70. Y. Lu, C. Futtner, J. R. Rock et al., Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung, *PLoS One* 2010, vol. 5, no. 6, ID e11022.
71. Gure, A.O., Stockert, E., Scanlan, M.J., Keresztes, R.S., Jager, D., Altorki, N. K., Old, L. J., and Chen, Y. T., Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000 , 97, 4198 – 4203.
72. C. Gontan, A. de Munck, M. Vermeij, F. Grosveld, D. Tibboel, and R. Rottier, Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation, *Developmental Biology* 2008, vol. 317, no. 1, pp. 296–309.
73. T. Hussenet, S. Dali, J. Exinger et al., SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas, *PLoS One* 2010, vol. 5, ID e8960.
74. 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.
75. Ji J, Zheng PS. Expression of Sox-2 in human cervical carcinogenesis. *Hum Pathol* 2010;41:1438-47.