



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

“Expresión de los marcadores OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina  
en cultivos enriquecidos de células troncales cancerosas de  
Cáncer Cérvico-Uterino”

**TESIS**

Que para obtener el título de

**BIOLOGA**

Presenta:

Verónica Beatriz Cruz Domínguez

Director de Tesis: Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez (INCan)

Asesor Interno: Dr. Edgar Ledesma Martínez

Septiembre 2014





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.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Marco teórico</b>	
• Cáncer.....	3
• Virus de Papiloma Humano.....	10
• Células troncales.....	14
• Células Troncales Cancerosas.....	16
• Marcadores de troncalidad.....	18
• Modelo de enriquecimiento de CSC.....	20
• OCT-4.....	22
• SOX-2.....	24
• Nanog.....	26
• b-catenina.....	28
<b>Planteamiento del problema</b> .....	30
<b>Hipótesis</b> .....	31
<b>Objetivo general</b> .....	32
<b>Objetivos específicos</b> .....	32
<b>Metodología</b> .....	44
<b>Resultados</b> .....	46
• Resultados de cultivo.....	36
• Resultados de citometría.....	39
• Tablas de citometría.....	53
• Resultados de tumorigenicidad.....	55
<b>Discusión</b> .....	56
<b>Conclusiones</b> .....	61
<b>Perspectivas</b> .....	62
<b>Literatura citada</b> .....	63

## Resumen

El cáncer es una enfermedad multifactorial originada por diversas causas, incluyendo factores genéticos, químicos, hereditarios y factores biológicos como la infección por el Virus del Papiloma Humano que se encuentra asociado al Cáncer Cérvico-Uterino. Este tipo de cáncer es la segunda causa de muerte por tumores en mujeres en países en vías de desarrollo, incluido México. Las terapias antineoplásicas actuales son insuficientes para contrarrestar esta enfermedad, ya que después de los tratamientos, algunas células que forman al tumor son resistentes. Esta resistencia es conferida a las Células Troncales del Cáncer (*del inglés* Cancer Stem Cells CSC), las cuales pertenecen a una pequeña población con características específicas tales como la capacidad de auto-renovación, “proliferación ilimitada”, además de la capacidad de iniciar y mantener el crecimiento del tumor. Los reportes demuestran que los antineoplásicos actuales no son capaces de eliminar a las CSC, las cuales desarrollan mecanismos de evasión y supervivencia, permaneciendo dentro del organismo aun después de tratamiento clínico.

OCT-4, SOX-2 y Nanog son factores de transcripción importantes para el mantenimiento del estado de pluripotencia y en la auto-renovación de las células troncales embrionarias (*del inglés* Embryonic Stem Cells ESC). Estos factores están reportados como marcadores de troncalidad de ESC y se han encontrado expresados en diferentes tumores. Por lo que podrían considerarse también como marcadores de troncalidad de las células troncales cancerosas, incluyendo a las CSC de Cérvix. La  $\beta$ -catenina es una proteína de gran importancia en procesos de migración, adhesión y proliferación celular.  $\beta$ -catenina está implicada en el mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación de las células troncales embrionarias, además de formar parte de la vía de señalización de Wnt, la cual está relacionada con los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. En varios tipos de cáncer se han observado alteraciones en la regulación de  $\beta$ -catenina.

En la presente tesis se realizó la evaluación de la expresión de OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina en cultivos enriquecidos de CSC. A partir de las líneas celulares derivadas de CaCU HeLa y SiHa, se obtuvieron cultivos enriquecidos de células troncales cancerosas y células progenitoras; posteriormente se analizó la presencia de las proteínas OCT-4, SOX-2, Nanog, y  $\beta$ -catenina por citometría de flujo. Los resultados muestran un incremento de las proteínas OCT-4, SOX-2, Nanog en una sub-población de esferas de HeLa y SiHa, con respecto a su contraparte en monocapa. Estos factores de transcripción podrían ser considerados como marcadores de células troncales de CaCU. Al igual se identificó la presencia de  $\beta$ -catenina en esta misma sub-población, sugiriendo un papel importante en las CSC.

## Marco teórico

### Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública considerada desde 2009 como la segunda causa de muerte a nivel mundial, precedido por las enfermedades cardiovasculares (Sudhakar A., 2009). El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) es una de las neoplasias de mayor incidencia y mortalidad en la población femenina (YA-MIN C *et al.*, 2012), es el segundo cáncer más común en mujeres de regiones en desarrollo y el décimo en regiones desarrolladas, con aproximadamente 529 000 nuevos casos de cáncer y 274 000 casos de muertes al año (Jacques F *et al.*, 2010).

El cáncer es un grupo de enfermedades multifactoriales inducido por agentes carcinógenos que pueden ser químicos, biológicos, hormonales, trastornos alimenticios, estrés oxidativo o radiación, predisposición genética e interacciones micro-ambientales (Franco EL and Rohan TE, 2001).

Una célula transformada escapa a los mecanismos de regulación de proliferación, reparación y muerte celular programada dando lugar a una generación de células anárquicas que a su vez pueden inducir cambios en las células vecinas. Además de las alteraciones ocasionadas por carcinógenos durante las divisiones celulares, donde se producen errores espontáneos en cada duplicación y los mismos se van acumulando constituyendo un factor intrínseco de riesgo (Martín de Civetta MT y Civetta JD, 2011).

Los agentes biológicos como los virus (tales como virus del papiloma humano (VPH), del Epstein Bar y de la hepatitis B y C) actúan introduciendo sus onco-proteínas al genoma de la célula blanco, modificando la expresión de oncogenes y anti-oncogenes celulares que promueven la transformación celular (Martín de Civetta MT y Civetta JD, 2011). El CaCU se encuentra asociado con la infección recurrente del virus de papiloma humano el cual es transmitido por vía sexual: Esta infección puede ser detectada del 5% al 40% de las mujeres en edad reproductiva y/o sexualmente activa (Franco EL and Rohan TE, 2001).

El proceso de carcinogénesis se divide en tres etapas:

**Iniciación.** Es la interacción irreversible de un carcinógeno con el DNA. Este proceso de iniciación es irreversible y al mismo tiempo estas células dañadas no pueden ser detectadas por el sistema inmune produciendo células precursoras de un tumor benigno o maligno (Franco EL and Rohan TE, 2001). A este carcinógeno se le llama iniciador y puede ser de tipo físico, químico o biológico. Una vez que una célula en particular ha sido afectada por un iniciador, es susceptible a la promoción. Cada iniciador es específico de algún tejido en particular, por ejemplo el virus de papiloma humano es específico de queratinocitos de la capa basal.

**Promoción.** Representa la etapa de crecimiento tisular con la formación de lesiones precancerosas. En esta etapa participan los factores de crecimiento y los receptores de los factores de crecimiento, así como la angiogénesis y la degradación de la matriz extracelular. Los factores de crecimiento son péptidos producidos por las mismas células o por células vecinas y actúan como promotores de la mitosis incorporando en fase S a algunas células que se encuentran en fase G0 o G1 prolongada (Martín de Civetta MT y Civetta JD, 2011). Una variedad de carcinógenos pueden inducir al tumor a la proliferación, por ejemplo la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que suprime al sistema inmune y permite la promoción del cáncer cervical, iniciado por papilomavirus.

**Progresión.** Distintas enfermedades incluyendo el desarrollo de lesiones premalignas de cérvix, implica el desarrollo de la capacidad de invasión y metástasis. A través de la adquisición de propiedades más agresivas, las células se han creado un fenotipo que les confiere la capacidad de crecer independiente de anclaje; producen sus propios factores de crecimiento y una desregulación de la expresión génica que le permite un crecimiento independiente de factores externos. Además de la acumulación de mutaciones que promueven una pérdida del control del ciclo celular. De igual forma estas células transformadas pueden adquirir la capacidad de metástasis a un tejido vecino o a distancia (Martín MT de Civetta y Civetta JD, 2011).

Hanahan y Weinberg han propuesto las características fenotípicas necesarias para un cáncer invasivo (2011) como se detallan a continuación (Figura 1):

**Mantenimiento de las señales de proliferación;** esta es la característica principal de las células cancerosas. En tejido normal existe un control específico en la producción y liberación de señales de división y crecimiento a través del ciclo celular, asegurando una homeostasis en el pool de células, manteniendo así la función y arquitectura del tejido. Las células cancerosas a través de la desregularización de estas señales, son capaces de regular su propio microambiente y proliferar de una manera ilimitada. Estas vías de señalización son iniciadas por factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie celular acoplados a dominios tirosina-cinasa. El dominio tirosina-cinasa transduce señales intracelulares que regulan la expresión de proteínas involucradas en el ciclo celular y en la supervivencia, así como el metabolismo energético. La mayoría de las células cancerosas producen sus propios factores de crecimiento lo que resulta en una estimulación de proliferación autocrina, de igual forma estos factores de crecimiento estimulan a las células normales asociadas al estroma tumoral a establecer un microambiente (nicho) que permite el desarrollo desregulado de las células cancerosas.

**Evasión de supresores de crecimiento;** las células cancerosas adquieren la capacidad de evadir los programas que regulan negativamente la proliferación celular, y estos programas dependen de genes supresores de tumor. Los dos genes supresores de tumor por excelencia son RB (retinoblastoma) y TP53, cuyas proteínas son necesarias para el control del ciclo celular y la proliferación, así como el control de muerte celular como la apoptosis. RB codifica para la proteína pRB cuya principal función es la regulación de la progresión del ciclo celular antes de entrar en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que ha pasado los puntos de control. En la presencia de daño al ADN la suma de las funciones normales de p53 y pRB se induciría un arresto en el ciclo celular para que la maquinaria de reparación de daño al ADN actúe. La mayoría de los cánceres poseen mutaciones en p53 y pRB, inactivando su función pro-apoptótica favoreciendo así la acumulación de mutaciones que favorecen el proceso de transformación celular.

**Evasión de la respuesta inmune;** las células y los tejidos están constantemente monitoreados por el sistema inmune, el cual se encarga de reconocer y eliminar a las células cancerosas evitando la formación de tumores. Los tumores que persisten de alguna manera han logrado evadir la detección por el sistema inmune evitando su erradicación. Las células cancerosas, evaden la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. Algunos de estos mecanismos de evasión incluye la secreción de TGF- $\beta$  (Yang *et al*, 2010), citocina que impide la activación adecuada de los CTL (Linfocitos Citotóxicos) y NK (Natural Killer). La mayoría de las células cancerosas carecen de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH) haciéndolas invisibles a los CTL's evitando así ser eliminadas.

**Inmortalización;** las células cancerosas necesitan un potencial de proliferación ilimitado a fin de generar tumores macroscópicos. La mayoría de los linajes de células normales en el cuerpo tienen un número limitado de ciclos de crecimiento y división celular (aproximadamente 50 divisiones) (Martín MT de Civetta y Civetta JD, 2011). En contraste cuando las células se propagan en cultivo, los ciclos repetidos de la división celular conducen primero a la inducción de la senescencia en donde solo las células capaces de eludir esta barrera muestran al final un potencial de replicación ilimitado. Este proceso se denomina inmortalización, una característica de las líneas celulares establecidas, tales como Hela (CaCu), K562 (leucemia mieloide aguda), M-CF7 (Cáncer de mama), CaLu 1 (cáncer de pulmón), SKBR-3 (cáncer de mama) y muchas más. La longitud de los telómeros está relacionada con la capacidad proliferativa de las células. Las células cancerosas poseen telómeros largos brindándoles la capacidad de proliferar ilimitadamente. Estos telómeros son sintetizados por la telomerasa, enzima que se encuentra activa en el proceso de carcinogénesis.

**Invasión y metástasis;** la adhesión célula-célula y la adhesión célula-matriz extracelular es primordial durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la integridad de los tejidos. Las proteínas encargadas de estas funciones son las caderinas, integrinas y selectinas. La desregulación de la función de las caderinas inhibe la activación de las vías de señalización que evitan la formación de uniones adherentes en las células, la deficiencia de la adhesión mediada por caderinas es uno de los principales factores que da a las células una característica tumoral; así mismo, contribuyen a que las células tumorales aumenten su movilidad y proliferación obteniendo caracteres invasivos y metastásicos. La falta de los complejos de adhesión celular funcionales en tumores primarios permite la liberación de células cancerosas, para más tarde invadir tejidos adyacentes a través de los nódulos linfáticos y vasos sanguíneos (Günther J *et al*, 2010).

**Inducción de angiogénesis;** al igual que el tejido normal, el tejido tumoral requiere nutrientes y oxígeno, así como una capacidad de eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono, la neo-vasculatura asociada al tumor es generada por el proceso de angiogénesis, proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. El proceso de angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Zhu Z and Write L, 1999). Algunos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores de superficie, estimulando o inhibiendo a las células endoteliales vasculares. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores son los principales reguladores de la formación de vasos sanguíneos. Además el VEGF existen distintas moléculas implicadas en la regulación positiva de la angiogénesis, incluyendo al factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), FGF básico, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), angiogenina, interleucina 8 (IL-8) y las angiopoietinas (Ang-1 y -2) (Yancopoulos GD *et al.*, 2000).

**Inestabilidad del genoma y mutación;** la adquisición de las múltiples características de las células cancerosas, depende en gran parte de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. La inactivación de genes supresores de tumor, pueden ser adquiridos a través de mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA, modificaciones de las histonas y miRNAs principalmente (Hanahan D and Weinberg R, 2011). La inestabilidad genómica originada por la falta de regulación, está caracterizada por un incremento en la tasa de mutación en genes antiapoptóticos y proapoptóticos. Tal es el caso del gen TP53 que es un supresor de tumores localizado en el cromosoma 17, que codifica para la proteína p53, el cual es un factor de transcripción que regula el crecimiento celular y la muerte celular programada, inducida por estrés celular. La forma más común de interrumpir la vía p53 es a través de un punto de mutación que inactiva su capacidad para unirse a su secuencia de reconocimiento blanco (Vogelstein B *et al.*, 2000). La mutación en p53 es la más frecuente en células cancerosas siendo detectada en más del 50% de las neoplasias malignas (Perry ME and Levine AJ, 1993).

**Resistencia a muerte celular;** la muerte celular programada (apoptosis) actúa como una barrera natural para el desarrollo del cáncer, investigaciones han revelado los mecanismos de evasión de la apoptosis en varios tipos de tumores malignos y en tumores resistentes a quimioterapia. La familia Bcl-2 es reguladora de la apoptosis, localizada en la membrana mitocondrial, cuya función principal es inhibir la apoptosis. En tejidos adultos se expresa en células de rápida división y diferenciación. En los tejidos linfoides, Bcl-2 se expresa fuertemente en células T, células pro-B y en células B maduras. En tumores la sobreexpresión de Bcl-2 participa en la carcinogénesis mediante la supresión de la muerte celular programada y la extensión de la vida media de las células neoplásicas (Hanahan and Weinberg, 2011).

**Desregulación de energía celular;** la proliferación celular crónica e incontrolada que presentan las células cancerosas implica no sólo desregulación de la proliferación celular, sino también ajustes en el metabolismo energético. Bajo condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, primero en piruvato a través de la glucólisis en el citosol, posteriormente, a dióxido de carbono en la mitocondria. En condiciones anaeróbicas, la glucólisis es favorecida y poco piruvato es enviado a las mitocondrias que consumen oxígeno. Otto Warburg (1931) observó por primera vez una característica del metabolismo de la energía celular en células cancerosas, observó que en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de glucosa, y por lo tanto su producción de energía, limitando su metabolismo a la glucólisis, lo que lleva a un estado de glucólisis aeróbica. Esta dependencia de la glucólisis es aún más acentuada por las condiciones hipóxicas que operan dentro de muchos tumores, el sistema de respuesta a la hipoxia actúa pleiotropicamente para regular el incremento de los transportadores de glucosa y múltiples enzimas de la vía glucolítica. La alteración del metabolismo de la energía está demostrando ser tan generalizada en las células cancerosas como muchos de los otros rasgos asociados con el cáncer que han sido aceptados como características del cáncer.

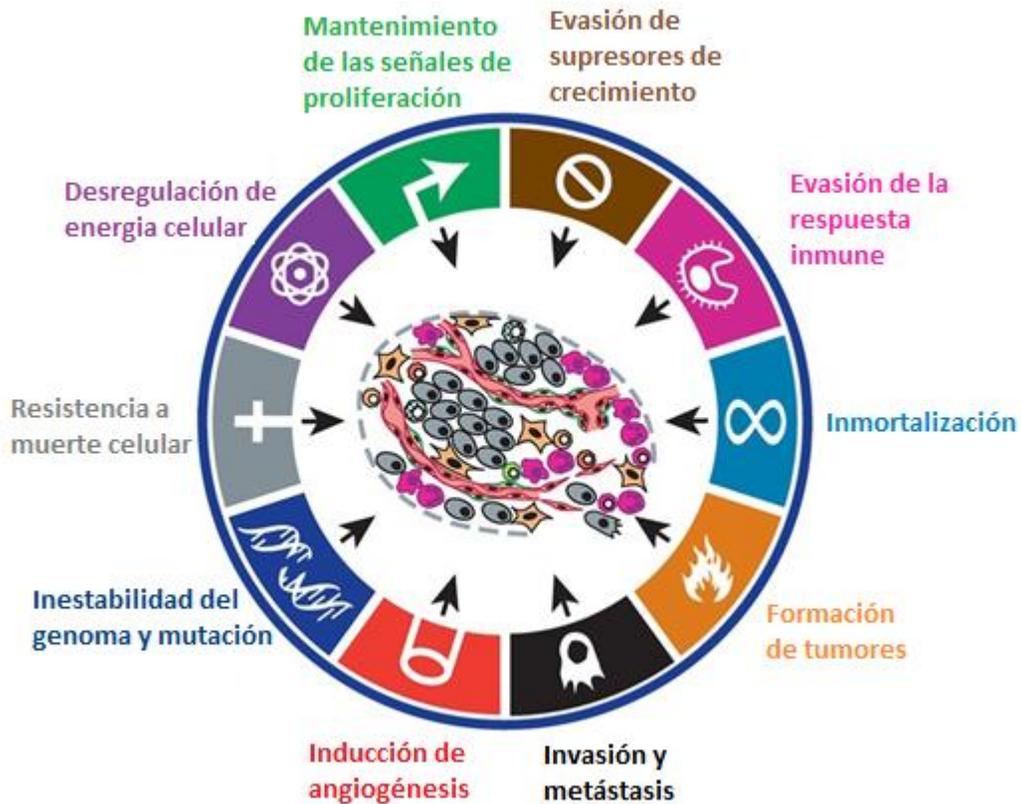


Figura 1. Las células cancerosas adquieren un fenotipo que les confiere características de supervivencia dentro de un tumor (tomada y modificada de Hanahan D and Weinberg R, 2011).

## Virus de Papiloma Humano y Cáncer Cérvico-Uterino

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional de la Taxonomía de los Virus (ICTV), estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son altamente específicos del epitelio mostrando un tropismo por los queratinocitos no diferenciados de mucosas y piel (de Villiers EM *et al.*, 2004).

El VPH es un virus de ADN circular de doble cadena con cápside icosaédrica de 72 capsómeros, que contiene un genoma de aproximadamente ocho mil pares de bases y mide de 50 a 55 nm. La cápside consta de 2 proteínas, la proteína L1 de 55 kDa y la proteína L2 de 75 kDa. El genoma viral del VPH se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR), la región que corresponde a los genes tempranos (E1 a E8) y la región que corresponde a los genes tardíos (L1 y L2). La LCR es la región no codificadora que contiene las secuencias promotoras y potencializadoras críticas que regulan la replicación y la transcripción viral (Figura 2). Los genes tempranos codifican para proteínas involucradas en la replicación, la transformación celular y son responsables de la desregulación de la proliferación de las células infectadas. Estos genes codifican para seis proteínas con diferentes funciones, la E1 coopera con la E2 para mantener el genoma en estado episomal y se comporta como un ADN helicasa durante la replicación del genoma viral. La proteína E2 permite la transcripción y replicación del ADN viral y en tipos de alto riesgo actúa inicialmente como regulador de la expresión de los genes E6 y E7. La expresión de la proteína E4 es necesaria para la producción de la proteína L2 e interacciona con citoqueratinas para liberar a los viriones generados. La E5 se une a factores de crecimiento y participa en la evasión del sistema inmune, desregulando la presentación de antígenos por parte del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

Se han identificado hasta el momento más de 120 tipos diferentes de VPH, clasificados en base a la secuencia de DNA y homológica en los genes E6, E7 y L1 (Franco EL and Rohan TE, 2001). Existen VPH de alto y bajo riesgo en relación a su capacidad para participar en el desarrollo de una neoplasia. Los VPHs de alto riesgo están relacionados con el desarrollo de CaCU, dentro de los que se encuentran los tipo 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 68 y 66 (Muñoz N *et al.*, 2004), siendo el VPH tipo 16 el que se ha identificado en el 50% de los casos y los 18, 31 y 45 identificado en el 25-30% del resto (Zacarias FM, 2006). Los virus de bajo riesgo tienen baja o nula capacidad de producir CaCU, sin embargo están relacionados con la generación de verrugas genitales o cambios pequeños en el cuello uterino, dentro de este grupo están los VPH tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81 (Muñoz N *et al.*, 2004).

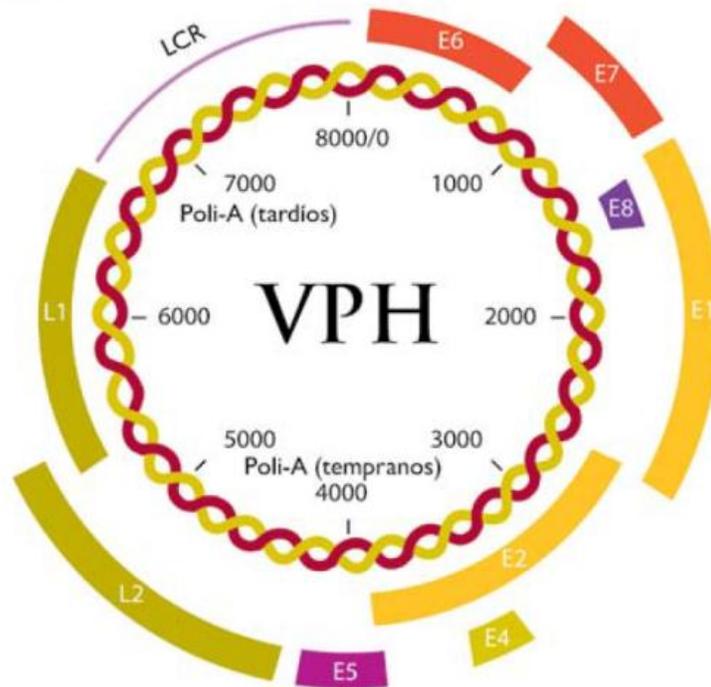


Figura 2. Genoma del VPH. El genoma viral del VPH se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR; la región que corresponde a los genes tempranos (E1 a E8) y la región que corresponde a los genes tardíos (L1 y L2) (Tomado de López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

La infección ocurre cuando las partículas que contienen el virus, entran a las células basales a través de una abertura en el epitelio estratificado (lesión o microtrauma) (Giroglou T *et al.*, 2001). La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión puede ser por rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitirá el transporte del DNA viral al núcleo de esta (Li M *et al.*, 1998). Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2 (Wilson VG *et al.*, 2002), que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contiene el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S (Figura 3) (López-Saavedra y Lizano-Soberón., 2006).

Las proteínas E6 y E7 retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular a través de la interacción con sus blancos, entre las que encontramos a la proteína p53 (Sherman L *et al.*, 1997). Para que produzca viriones infecciosos, los VP amplifican su genoma y lo empaquetan en partículas proteicas. Esto ocurre en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Entre las proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, están E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación se requiere que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral, el ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. Las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas (Doorbar J *et al.*, 1991).

El VPH es un agente patógeno asociado al cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), demostrado por el Dr. Harald Zur Hausen en los 80's. La infección por este virus es una de las infecciones más comunes transmitidas sexualmente, tanto en hombres como en mujeres en todo el mundo. Se ha observado que el 99.8% de los casos de CaCU se deben a tipos de VPH de DNA tumoral (López-Saavedra y Lizano-Soberón., 2006), dentro de los cuales se incluyen a los tipos 16 y 18. El CaCU es el segundo tipo de cáncer más común en las regiones en vías de desarrollo (452 000 casos) y es sólo el décimo cáncer más común en regiones desarrolladas (76 000 casos). Los cánceres de mama y de cuello uterino representan el 33% de los nuevos casos de cáncer en mujeres, pero sólo el 25% de estos corresponde a muertes por cáncer en la población femenina. Para 2008 hubo 529 000 nuevos casos de CaCU, el 85% se produce en países en desarrollo, en donde representa el 13% de todos los cánceres femeninos, y 275 000 muertes del cual 88% se produce en países en vías de desarrollo (Jacques F *et al.*, 2010), en donde ubicamos a México.

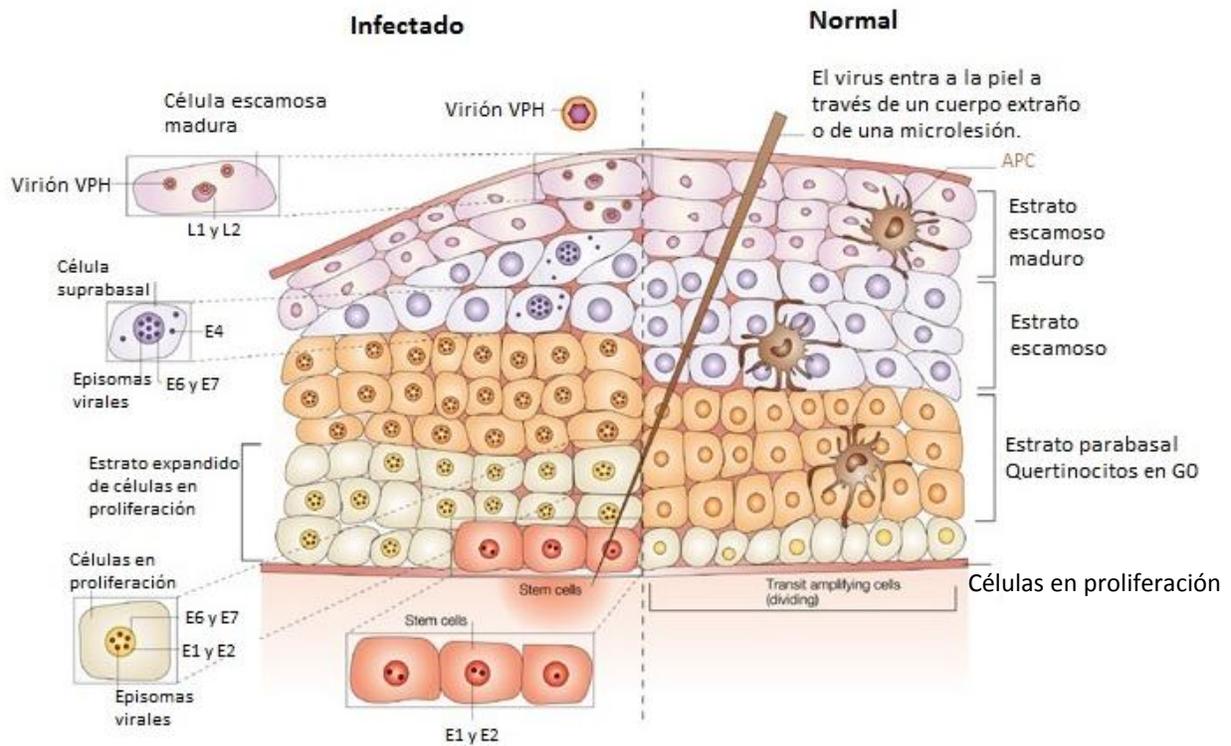


Figura 3. Arquitectura del epitelio estratificado del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección. En el epitelio normal las células germinales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior. En el epitelio infectado, el VPH infecta a las células de la membrana basal, se expresan las proteínas tempranas. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las capas superiores del epitelio (Obtenida de Ian H Frazer, 2004).

## Células troncales

Las células troncales (CT) o (del inglés *stem cells* SC) son células no diferenciadas presentes en tejido embrionario y diferentes tejidos somáticos adultos. Las CT presentan tres características distintivas: tienen la capacidad de auto-renovación, la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes y mantener un estado homeostático. La combinación de estas tres propiedades hace que las células troncales sean únicas (Jordan TC *et al.*, 2006). Para mantener esta homeostasis hay un equilibrio entre la auto-renovación de células troncales y la generación de células diferenciadas. Este equilibrio puede darse de dos maneras; una en donde la célula troncal se divide simétricamente, dando lugar a dos células troncales que heredan las características de la célula original o da lugar a dos células progenitoras; en la división asimétrica, la célula troncal se divide dando lugar a una célula troncal y a una célula progenitora (Figura 4). Este control homeostático es característico de una célula troncal y siendo capaz de detenerse cuando el pool está completo para evitar el crecimiento aberrante o pérdida de tejido y mantener el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación (Blanpain C and Fuchs E, 2009). Las células troncales presentan una alta capacidad de generar varios tipos de células diferenciadas dependiendo de su potencialidad, ya sea directamente o a través de una serie de divisiones determinadas.

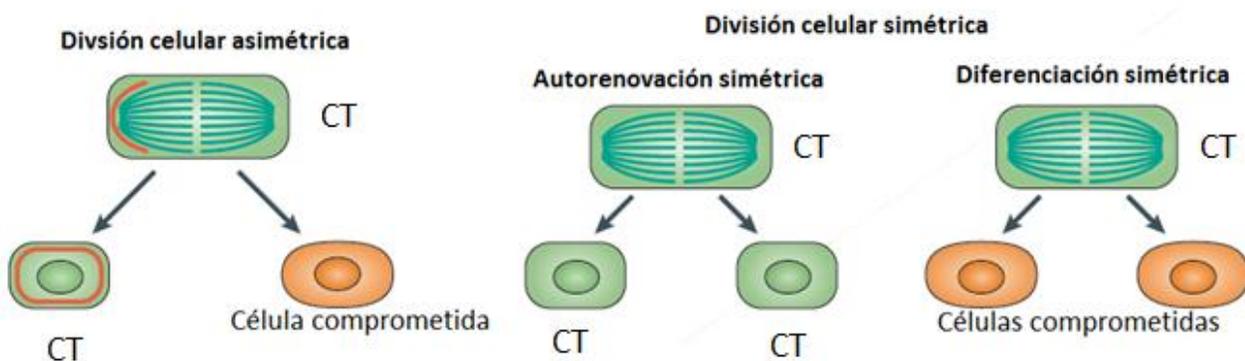


Figura 4. Una célula troncal (CT) se puede dividir en dos células idénticas a la original (división simétrica), en donde las CT se auto-renuevan o se diferencian, o bien una CT puede dividirse en una célula troncal y una célula progenitora (división asimétrica) (Modificada de Blanpain C and Fuchs E, 2009).

Las células troncales pueden clasificarse según dos criterios: por su origen y por su potencialidad. Según su origen, se clasifican en células troncales embrionarias (CTE) que son capaces de dar origen a las tres capas embrionarias, y las células troncales adultas que poseen un compromiso hacia un linaje específico. Según su potencialidad, las CT pueden clasificarse como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y monopotentes (Prosper F and Verfaillie C, 2003). Las células troncales totipotentes dan lugar a la formación de tejido embrionario y extraembrionario, a partir de estas estructuras se forma un individuo completo. Hasta el estadio de mórula, las células conservan su totipotencialidad y tras el cuarto día, alcanza el estadio de blastocisto, en donde las células son pluripotentes y tienen la capacidad de dar lugar a las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no a tejido extraembrionario. Las células troncales de los tejidos tras el nacimiento, o células troncales adultas, pueden ser multipotentes o bipotentes siendo capaces de dar origen a uno o pocos tipos celulares, por ejemplo de la células troncales del sistema nervioso (Gaje FH *et al.*, 1995), células troncales de mama (Jordan TC *et al.*, 2006), células troncales de piel (Blanpain C and Fuchs E, 2009), células troncales de hígado (Faris RA *et al.*, 2001), células troncales de páncreas (Bouwens L and Roman I, 2005), medula ósea (Weissman IL *et al.*, 2000), células troncales de riñón (Haller H *et al.*, 2005), entre otros (Figura 5).

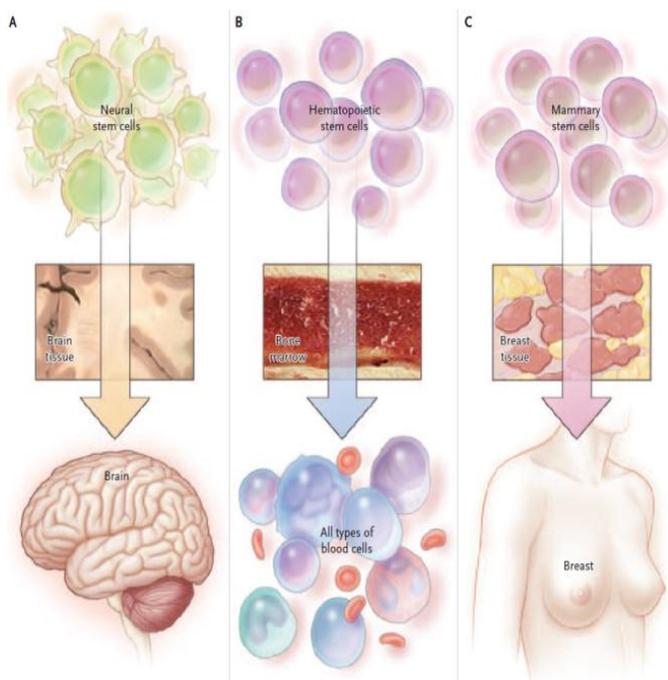


Figura 5. Células troncales encontradas en Tejido somático adulto, A) Células troncales neuronales dan lugar al sistema nervioso central, B) Células troncales hematopoyéticas que dan lugar a todos los tipos celulares en sangre, C) Células troncales mamarias que dan lugar a células de mama (tomada de Jordan TC *et al.*, 2006).

## Células Troncales del Cáncer

Se ha demostrado la existencia de células con características tipo troncal con un alto potencial tumorigénico, para lo cual se han propuesto dos teorías sobre el origen del tumor, el modelo jerárquico y el modelo estocástico (Figura 6). El modelo estocástico establece que todas las células dentro de la masa tumoral tienen un bajo potencial para formar tumores. Por el contrario, el modelo jerárquico propone que solo una pequeña población de células tiene la capacidad de iniciar y mantener el crecimiento tumoral, dando lugar a los diferentes tipos celulares que componen la masa del mismo (Van-Vlerken LE *et al.*, 2012). Este modelo ha sido respaldado por Dick y colegas que demostraron que la leucemia mieloide aguda se origina de células primitivas con características de célula troncal y con una alta capacidad tumorigénica, ya que solo 200 células inoculadas en ratones tienen la capacidad de originar crecimiento tumoral (Hope KJ *et al.*, 2004). Esta pequeña población se ha denominado como células troncales cancerosas (CTC o del inglés *Cáncer Stem Cells*, CSC).

Esta pequeña población presenta características muy similares a las células troncales normales, tales como la auto-renovación, mecanismos anti-apoptóticos, etc. Algunas CSC poseen características que le confieren la capacidad de migrar a órganos cercanos o a distancia (metástasis) para dar lugar a un nuevo tumor. Se ha demostrado que las CSC son una pequeña población que adquiere resistencia a medicamentos y son responsables de la reincidencia de un tumor aun después de una quimioterapia debido a que no han sido destruidas completamente, lo que sugiere la adquisición de características asociadas con resistencia multidrogas relacionada con resistencia a apoptosis haciendo que los tratamientos actuales no sean los más indicados (Van-Vlerken LE *et al.*, 2012).

Es por esto que se requieren estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a las CSC. Hasta ahora la identificación precisa de estas células no es posible debido a la falta de marcadores específicos que las distingan entre la heterogeneidad celular tumoral. Es por esto que se busca caracterizar a las CSC de los diferentes tumores, en este caso de cérvix a través del modelo de esferas, descrito más adelante.

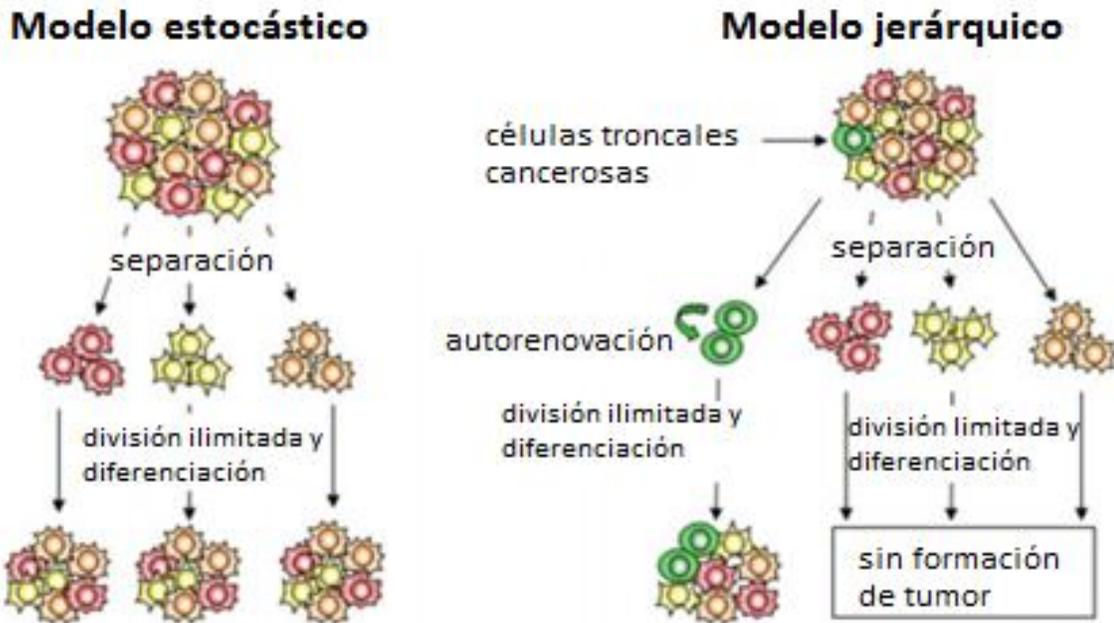


Figura 6. Dos modelos sobre el origen de las células troncales. Modelo estocástico: establece que todas las células dentro de un tumor tienen la capacidad de dar lugar a un nuevo tumor y el modelo jerárquico: propone que solo una pequeña población de células dentro de un tumor tienen la capacidad de dar lugar a una nueva masa tumoral (modificada de Van-Verklen LE *et al.*, 2012).

## Marcadores de troncalidad

En la última década se han utilizado metodologías basadas en la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1). La ALDH1 es una enzima desintoxicante responsable de la metabolización de aldehídos intracelulares y de la oxidación de retinol a ácido retinoico. Esta enzima es evaluada mediante el ensayo de ALDEFLUOR, que ha servido como marcador de células troncales/progenitoras en sistema neural, sistema hematopoyético y glándula mamaria (Ginestier C *et al.*, 2007). Esta técnica también se ha utilizado para aislar CSC de múltiples neoplasias tales como leucemia mieloide aguda, así como a partir de tumores cerebrales, de mama, de páncreas, entre otros.

Hoechst 33342 es un colorante de unión a ADN excitado por luz UV que por citometría de flujo ha demostrado que en un ambiente sano las células en G1 forman una población circular, las células en G2 caen a lo largo de la diagonal y la población en apoptosis se mueve a la derecha. La SP (del inglés *side population* o población lateral) se ubica a la izquierda de la población en G1, esta población fue identificada por primera vez en médula ósea de ratón (Goodell M *et al.*, 1996) y se comprobó que está altamente enriquecida de células troncales hematopoyéticas o células progenitoras que tienen la capacidad de excluir activamente Hoechst 33342.

La resistencia a multidrogas es una de las características que desarrollan las CSC. La familia ABC, es un grupo de proteínas que conforman bombas de expulsión de drogas en células troncales normales y cancerosas. La expresión elevada de las proteínas ABC se observa no sólo en células troncales adultas, sino también en CSC de tejidos malignos y es ampliamente utilizado para detectar y aislar células somáticas troncales y progenitoras. La SP surge de la acción de las bombas de membrana que activan el flujo de salida del colorante. En este proceso están implicadas bombas de resistencia a múltiples fármacos como por ejemplo la proteína ABCG2. Se ha demostrado que la proteína ABCG2 responsable de la exclusión del colorante Hoechst del interior de la célula en cáncer de mama (Alvi AJ *et al.*, 2003), de pulmón (Hirschmann-Jax C *et al.*, 2004), de próstata (Raaijmakers MH *et al.*, 2005), de tracto Gastrointestinal (Haraguchi N *et al.*, 2006), de cabeza y cuello (Chen JS *et al.*, 2006), de páncreas (Olempska M *et al.*, 2007), de carcinoma nasofaríngeo (Wang J *et al.*, 2007), de neuroblastoma y glioblastoma (Hirschmann-Jax C *et al.*, 2004), de glioma, de leucemia (Raaijmakers MH *et al.*, 2005) y de retinoblastoma (Seigel GM *et al.*, 2005; Mohan A *et al.*, 2006).

En cáncer de mama se identificó y aisló por primera vez a las CSC de un tumor sólido (Al-Hajj *et al.*, 2003) en donde se describe una población celular con el fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>, la cual es capaz de iniciar tumor al ser inoculada en ratones. CD133<sup>+</sup> ha sido identificado en células troncales de cáncer colorectal (O'Brien CA *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani L *et al.*, 2007) y en carcinoma pancreático (Hermann PC *et al.*, 2007). Además se ha demostrado ser marcador de células troncales neurales normales, tanto en humano (Uchida N *et al.*, 2000) como de ratón (Lee A *et al.*, 2005) y posiblemente de células pancreáticas (Oshima Y *et al.*, 2007).

Además del fenotipo, las CSC se caracterizan por la expresión de los genes OCT-4, SOX-2 y Nanog, cuyas proteínas son factores de transcripción esenciales para la regulación de la auto-renovación y la pluripotencia de células troncales embrionarias y adultas. Estos factores de transcripción están estrictamente regulados durante la diferenciación y son considerados marcadores de troncalidad, también se ha reportado que estos factores trabajan de manera cooperativa para regular otros genes involucrados en el mantenimiento de la troncalidad de la célula. En cultivos de cordón umbilical porcino, se ha encontrado tanto en mRNA como en proteína a OCT-4, SOX-2 y Nanog, estos factores están relacionados con la regulación de la pluripotencia y auto-renovación tanto conjunta como individualmente en células troncales embrionarias (Ryan C *et al.*, 2006).

## Modelo de enriquecimiento de CSC

El ensayo de formación de esferas es una metodología utilizada como modelo de estudio de CSC, siendo un método *in vitro* que permite obtener poblaciones enriquecidas de células troncales y progenitoras tempranas, basados en el hecho de que las células troncales, tanto normales como cancerosas tienen la capacidad de crecer en agregados celulares en un medio libre de suero, que contenga factores específicos, como factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) (Visvader and Lindeman, 2008).

En 1996 fue desarrollado el modelo de neuroesferas para estudiar la neurogénesis, este modelo es el mejor estudiado en términos de clonalidad y diferenciación multipotencial. Este modelo ha sido la base para el desarrollo de esferas a partir de diversos tejidos como en cáncer de cerebro (Hemmati *et al.*, 2003) y en cáncer de mama (Dontu *et al.*, 2003). En el ámbito de las células de Cáncer Cérvico-Uterino; Santiago y colaboradores en 2012 utilizan líneas celulares de CaCU con y sin VPH, para generar esferas y así obtener poblaciones enriquecidas de CSC, en este estudio se evalúa la expresión de diferentes genes y proteínas relacionadas con otros tipos de cáncer.

Las características comunes que definen a las células troncales son la capacidad de auto-renovación y diferenciación, por lo tanto, los niveles de los factores de transcripción que mantienen la pluripotencia están estrictamente controlados para mantener el estado indiferenciado. Estos factores forman una red de regulación para apoyar o limitar el nivel entre ellos para mantener las características de célula troncal (Figura 7). Hasta ahora, se han identificado varios factores de transcripción esenciales para el mantenimiento de las células troncales embrionarias, entre los cuales están OCT-4, Nanog y un factor inhibidor de la HMG (High Mobility Group), SOX-2 (Boyer LA *et al.*, 2005). En un estudio de cultivo de mammoesferas se demostró un incremento en la expresión de OCT-4, SOX-2 y Nanog en una población enriquecida en HER2<sup>low</sup> que es un receptor muy estudiado en varios tipos de tumor, y en este estudio consideran a OCT-4, SOX-2 y Nanog como posibles marcadores de CSC de mama (Oak PS *et al.*, 2012).

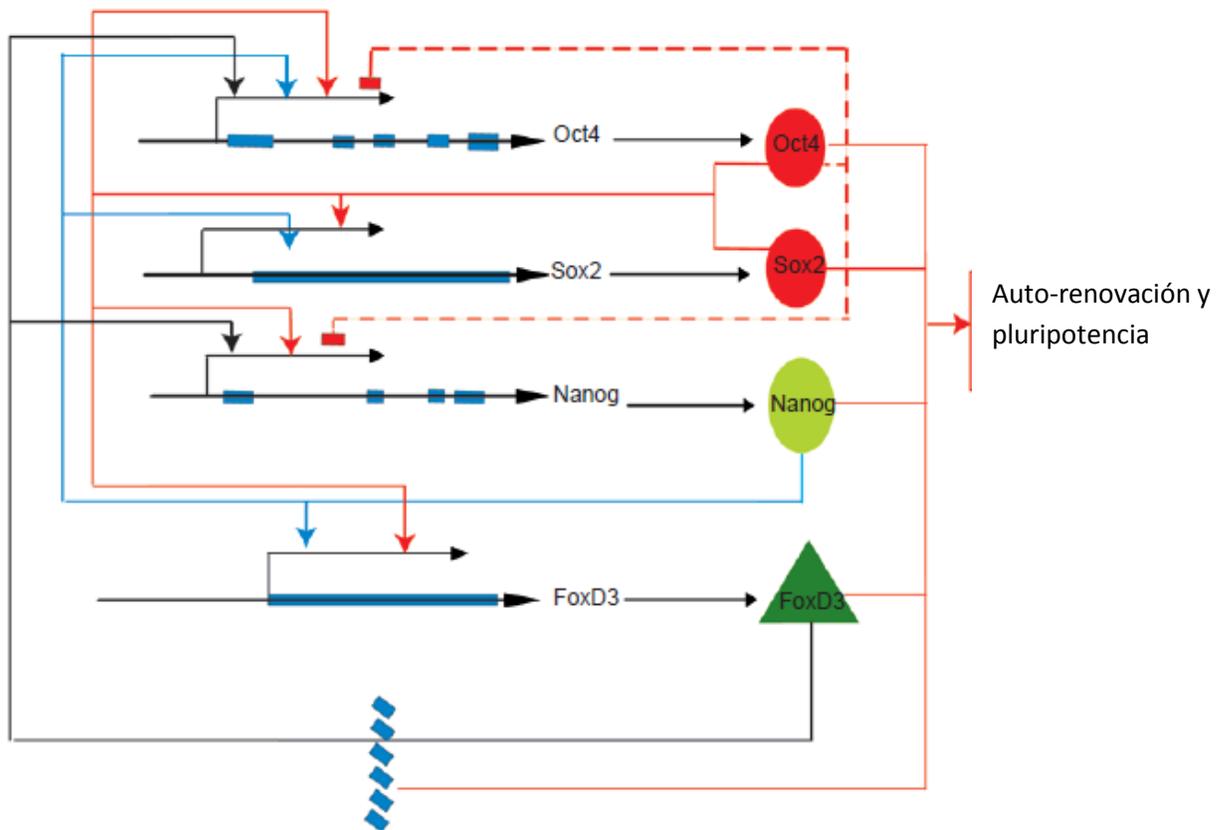


Figura 7. OCT-4 SOX-2 Nanog FoxD3 son importantes factores de transcripción que regulan la pluripotencia y auto-renovación de las células troncales embrionarias. Siendo FoxD3 un importante regulador de la activación de los mismos (tomado de Pan G and Thompson JA, *et al.*, 2007)

## OCT-4

OCT-4 es un factor de transcripción involucrado en el mantenimiento de la pluripotencia y auto-renovación de células troncales embrionarias. OCT-4 pertenece a la familia de factores de transcripción de dominio POU que están implicados en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación en una variedad de tejidos (Ryan AK and Rosenfeld MG, 1997). La expresión de OCT-4 se limita normalmente a las células pluripotentes del embrión en desarrollo, incluyendo las células del epiblasto, células germinales primordiales y sus homólogos *in vitro*, células troncales embrionarias y células germinales embrionarias, respectivamente (Pesce M and Scholer HR, 2001). Además, OCT-4 se expresa transitoriamente en el endodermo en desarrollo (Palmieri SL *et al.*, 1994) y neuroectodermo del embrión (Reim G and Brand M, 2002), donde se define hacia que linaje se diferenciaran las células.

OCT-4 tiene tres isoformas principales codificadas por corte y empalme alternativo, denominadas OCT-4A, OCT-4B y OCT-4-B1 (Figura 8). Las variantes OCT-4A y OCT-4B se identificaron en 1992, la mayoría de los informes se han centrado en el estudio de OCT-4A, que ha sido confirmado como el factor de transcripción responsable de la pluripotencia. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un creciente interés en OCT-4B, que no está involucrado en la auto-renovación de CES, pero responde a situaciones de estrés celular relacionadas. OCT4-B1 es una variante de corte y empalme (de Xia W and Jianwu D, 2010).

### **Las isoformas de OCT-4 generado por splicing alternativo y traducción alternativa.**

El gen OCT-4 en humanos está localizado en el cromosoma 6p21.3, Takeda y colaboradores (1992) mostraron que este gen sufre splicing alternativo, generando a las variante A y B. OCT4-B1 es la nueva variante del gen OCT-4 (Atlasi Y *et al.*, 2008) (Figura 8). Las tres variantes de transcripción de OCT-4 son diferentes en el extremo 5' e idénticas en extremo 3' terminal. OCT-4A consta de los exones 1, 2b, 2d, 3 y 4, entre los que el exón 1 es único de OCT4-A, OCT-4B difiere en el exón 2b. OCT-4-B1 es casi idéntico a OCT-4B pero tiene un exón adicional, el 2c (de Xia W and Jianwu D, 2010).

La proteína OCT-4A consta de 360 aminoácidos, de un dominio N-transactivación, dos dominios POU y un dominio C-transactivación. Este dominio N-transactivación es único para OCT-4, a través del dominio POU de unión a ADN, OCT-4A puede unirse específicamente al motivo conservado del sitio octamérico ATTTGCAT, a través del cual OCT-4A reconoce regiones promotoras. El dominio C-transactivación se encuentra en células de dominio específico y su actividad de transactivación está mediada por el dominio POU. La proteína de OCT-4B se compone de 265 aminoácidos. Suo y colaboradores identificaron un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma presente en el exón 2a-b del ARNm de OCT-4B, por lo que la transcripción puede ser traducida a partir del sitio interno del ARNm. Al inicio de la traducción alternativa, OCT-4B puede codificar al menos tres isoformas de proteínas: OCT-4B-265 (inicia a partir del primer codón de inicio ATG y consiste en 265 aminoácidos), OCT-4B-190 (inicia en el primer codón de inicio CTG y consiste en 190 aminoácidos) y OCT-4B-164 (inicia en el segundo codón de inicio ATG y consiste en 164 aminoácidos) (figura 8) (Xia W and Jianwu D, 2010).

OCT-4 se considera como un marcador de células troncales, puesto que se encuentra expresado en células troncales embrionarias pluripotentes y cuando las células entran en proceso de diferenciación, OCT-4 disminuye su expresión. OCT-4 ha sido propuesto también como marcador de células troncales en algunos tipos de cáncer, como melanoma (Strizzi L *et al.*, 2008).

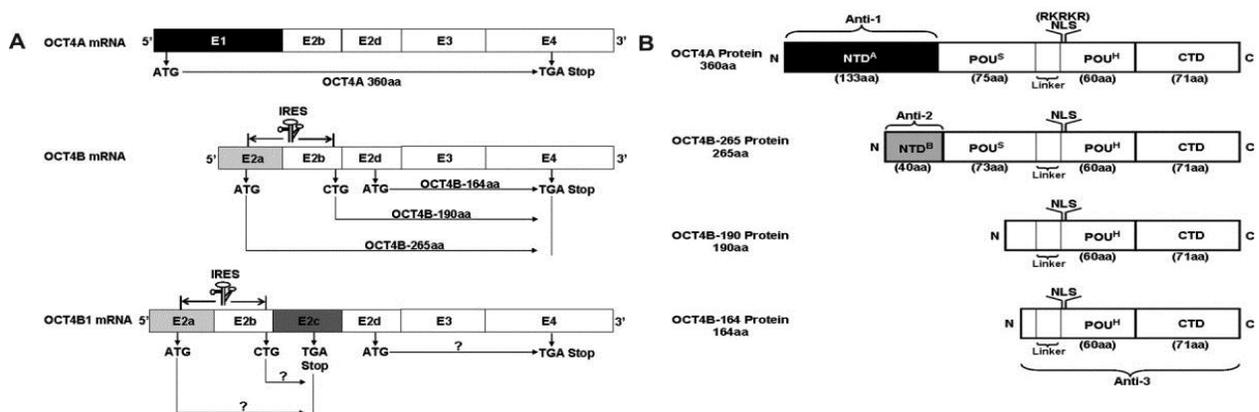


Figura 8. Estructura esquemática de transcripción e isoformas de la proteína de OCT-4. A) Estructura esquemática de OCT-4 transcripción e isoformas. B) Estructura esquemática de las isoformas de las proteínas de OCT-4 (Tomado de Xia W and Jianwu D, 2010).

## SOX-2

SOX-2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los SOX (de SRY dependiente de la secuencia HMG (Grupo de alta movilidad)). Estructuralmente SOX-2 presenta un dominio HMG altamente conservado, un dominio N-terminal y un dominio de transactivación dentro del dominio C-terminal (Figura 9). El dominio de la HMG se compone de tres hélices alfa, que participan en la unión al ADN así como en la interacción con las proteínas asociadas como OCT-1 y OCT-4, contienen una región C-terminal rica en serina, estos extremos C-terminal son esenciales para la transactivación (Chakravarthy H and Rizzino A, 2009).

Este sitio se encuentra adyacente a un sitio de unión para el sitio POU de OCT-4. Estudios de mutagénesis revelan que la alteración de ciertas bases dentro del motivo de la HMG, o destrucción del motivo de la HMG reduce la funcionalidad global del cassette HMG/ POU. La importancia de la cooperatividad entre los dos sitios se enfatiza aún más por un estudio que demuestra que la presencia de un motivo inhibidor de la HMG se compensa funcionalmente por la presencia de un motivo POU y viceversa (Boer B *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado que SOX-2 y OCT-4, junto con los miembros del complejo represivo polycomb (remodeladores de la cromatina) están asociados a la expresión de cientos de genes en células ES. Esto sugiere que una gran red de genes está controlada por éstos reguladores tanto en células troncales embrionarias humanas como de ratón. Al respecto, una comparación de las proteínas SOX-2 humanas y de ratón revela pequeñas diferencias en su secuencia de aminoácidos, pero ninguna diferencia en la funcionalidad de las dos proteínas (Boyer LA *et al.*, 2005).

SOX-2 es un regulador de las células troncales embrionarias y adultas, y de células troncales neurales (Episkopou V, 2005; Okita K and Yamanaka S, 2006). SOX-2 también es esencial para la formación del epiblasto del embrión temprano de mamíferos. La expresión de SOX-2 es necesaria para el control del desarrollo temprano y el mantenimiento del estado de pluripotencia. SOX-2 se expresa en células pluripotentes de la ICM (masa celular interna) y del epiblasto que dan lugar a todos los tipos celulares de un organismo completo. Más tarde, se limita a la placa neural en desarrollo de la que surge el sistema nervioso. La expresión de SOX-2 es esencial para el inicio del desarrollo neural y se ha demostrado que la expresión de SOX-2 causa neurodegeneración y alteraciones en la neurogénesis en ratón (Ferri AL *et al.*, 2004).

SOX-2 actúa como un oncogén de supervivencia para la expresión de células troncales pluripotentes. En células de cáncer de ovario, SOX-2 se co-exprende junto con OCT-4 y Lin28 (Peng S *et al.*, 2010; Zhong X *et al.*, 2010). En los carcinomas de mama, se requiere la expresión de SOX-2 para la formación de mammoesferas como parte de sus propiedades de célula troncal (Leis O *et al.*, 2012). En cáncer de colon, la expresión SOX-2 induce metástasis a ganglios linfáticos y a distancia (Neumann J *et al.*, 2011).

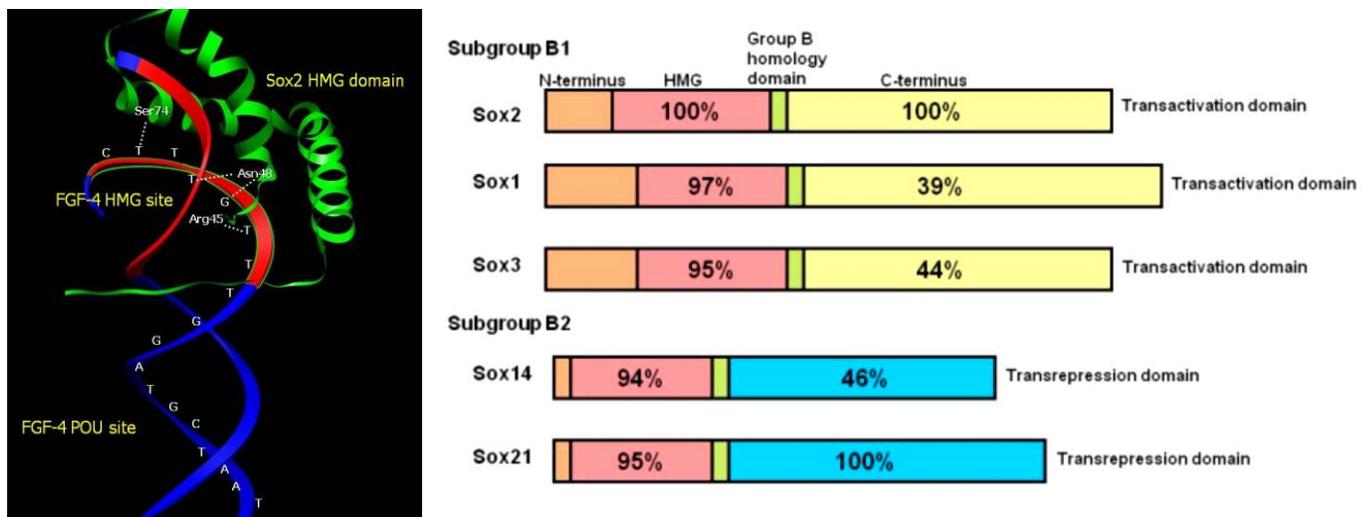


Figura 9. SOX-2 contiene un dominio N-terminal, un dominio HMG y un dominio C-terminal. En la figura se muestra la homología entre SOX-2 y otros miembros de la familia SOXB (Chakravarthy H and Rizzino A, 2009).

## Nanog

Estructuralmente, la proteína Nanog contiene un dominio N-terminal, un homeodominio y un dominio C-terminal. El dominio N-terminal de 96 aminoácidos contiene ácidos ricos en serina, y contiene un único dominio C-terminal bien conservado de 50 aminoácidos (Figura 10) (Pan G and Pei D *et al.*, 2003).

Nanog es un factor de transcripción que fue identificado por su capacidad de mantener células ES en ausencia del factor de crecimiento LIF (factor inhibidor de leucemia), el cual está identificado como un marcador de pluripotencia. La sobreexpresión de Nanog aumenta la capacidad de auto-renovación y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células (Darr H *et al.*, 2006). En estudios con embriones de ratón que carecen de Nanog, se observa una dificultad para llegar al estado de blastocisto debido a la ausencia del epiblasto (Mitsui K *et al.*, 2003).

Nanog está involucrado en la proliferación y la auto-renovación de las células, se expresa en células de la masa celular interna y en células troncales embrionarias. Mantiene la pluripotencia de las ESC y evita su diferenciación a endodermo y ectodermo. Para células ES de ratón, el papel más prominente de Nanog es que un alto nivel de este puede mantener la pluripotencia en ausencia del factor inhibidor de leucemia, por lo que Nanog es un importante factor río abajo en la cascada de factores extrínsecos (Chambers I *et al.*, 2003).

Ensayos de movilidad electroforética y chip muestran que OCT-4 y SOX-2 se unen al promotor de Nanog *in vitro e in vivo*. Además ensayos de mutagénesis indican que se requiere del motivo OCT-4/SOX-2 para la actividad del promotor de Nanog en las células pluripotentes. Estos hallazgos sugieren que OCT-4/SOX-2 actúan para promover la transcripción de Nanog. Sin embargo, los altos niveles de Nanog evitan que las células ES permanezcan en auto-renovación (Kuroda T *et al.*, 2005).

Por ensayos de hibridación *in situ*, se ha detectado la expresión de Nanog en embriones con déficit de OCT-4, lo que sugiere que Nanog se puede mantener sin OCT-4 y al igual sugiere que otros factores de pluripotencia pueden contribuir a la regulación de la expresión de Nanog (Chambers I *et al.*, 2003). FoxD3, otro factor de transcripción, es altamente expresado en células ES y en células pluripotentes del embrión temprano (Sutton J *et al.*, 1996). Cuando se suprime a FoxD3 en embriones de ratón, estos mueren poco después de la implantación, debido a la pérdida del epiblasto (Hanna LA *et al.*, 2002), un fenotipo algo similar a los embriones con deficiencia de Nanog, lo que ha hecho llegar a la conclusión de que FoxD3 es un activador de Nanog (Pan G *et al.*, 2006).

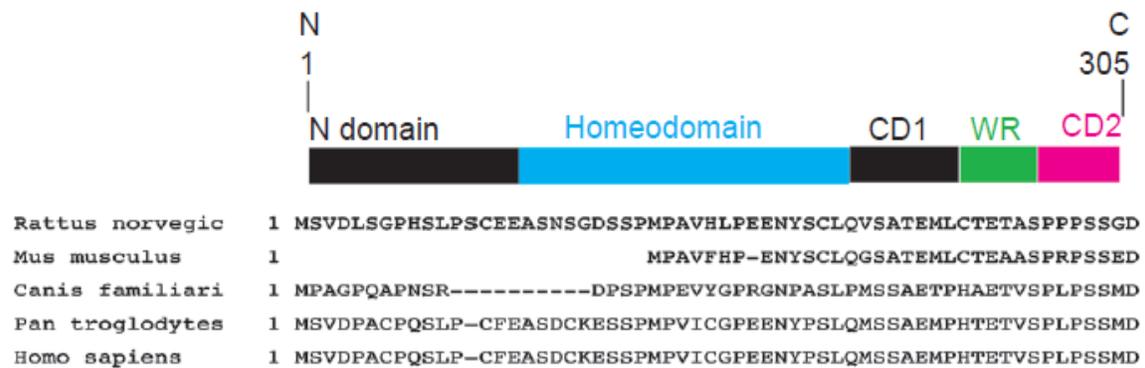


Figura 10. Estructura de Nanog, que contiene un dominio N-terminal, un homeodominio y un dominio C-terminal. Se muestra que entre ratón, perro y humano está altamente conservado y su estructura es muy parecida (tomado de Pan G and Thompson JA, *et al.*, 2007).

## $\beta$ -catenina

$\beta$ -catenina es una proteína de gran importancia en procesos de migración, adhesión y de proliferación celular, está compuesta por un extremo amino terminal ( $\text{NH}_2$ -terminal) de aproximadamente 130 aminoácidos seguidos por 12 secuencias repetidas en *tandem* de 42 aminoácidos, conocidas como repeticiones *arm*, y un extremo carboxilo terminal de 100 aminoácidos. Las regiones  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_2$  terminales son de carácter ácido, mientras que la región de repeticiones de dominio *arm* poseen un carácter básico (Kemler R, 1993; Wodarz A and Nusse R, 1998). En estas repeticiones *arm* se encuentran sitios de unión para algunos factores de transcripción como el factor aumentador linfóide 1 o LEF (*por sus siglas en inglés Lymphoid enhancer factor 1*). Esta proteína, en estado fosforilado interactúa con el factor de transcripción TCF/LEF y se transloca al núcleo (Willert K y Nusse R, 1998). Esta asociación regula la activación de una variedad de genes implicados en la división celular. Se ha descrito que el complejo  $\beta$ -catenina-TCF/LEF produce el incremento de la transcripción del gen *c-myc* y ciclina D1, las cuales son proteínas claves en la regulación de los procesos de división y diferenciación celular (Polakis P, 2000).

$\beta$ -catenina es un componente importante de la vía de señalización de Wnt en etapas tempranas del desarrollo, permitiendo la comunicación célula-célula durante una importante parte del desarrollo del sistema nervioso central. Proteínas extracelulares Wnt activan los receptores de *frz*, unidas a la membrana que a su vez fosforilan Dishevelled. A través de la unión a Axin Dishevelled inhibe la fosforilación de  $\beta$ -catenina mediante la interrupción de un complejo que consta de la polipos adenomatosa coli (APC) (Figura 11). Al activarse el receptor *frz*, se desactiva por su interacción con su ligando, GSK-3 $\beta$ . Cuando GSK-3 $\beta$  está activa, fosforila a  $\beta$ -catenina en múltiples sitios blanco marcándola para su ubiquitinización y degradación vía proteosoma (Kosik KS, 1999). Cuando la cinasa no está activa,  $\beta$ -catenina está estable y entonces puede transportarse al núcleo y co-activar la familia de factores de transcripción TCF/LEF, funcionando entonces también como factor de transcripción activando la expresión de genes de proliferación, auto-renovación, migración, etc. La vía Wnt- $\beta$ -catenina se relaciona con varias vías de señalización celular, tales como Notch, Hedgehog, Rac/K-RAS y mTOR, vías que también tienen como objetivo central coordinar el desarrollo de órganos o mantener en homeostasis ciertos tejidos. Así mismo un grupo importante de moléculas, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) interactúan con la vía Wnt- $\beta$ -catenina, regulando la actividad y el control de procesos celulares específicos.

Los genes c-myc y ciclina D son genes blanco activos en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (He TC *et al.*, 1998; Shtutman M *et al.*, 1999). Experimentos en *Drosophila* revelan que APC regula positivamente la señalización de  $\beta$ -catenina (Ahmed Y *et al.* 1998). APC es un gen supresor tumoral en cánceres humanos y su mutación se relaciona fuertemente con la regulación de  $\beta$ -catenina (Polakis P, 1999). Las mutaciones en  $\beta$ -catenina inactivan a APC. Esto es evidente en cáncer colorrectal donde la gran mayoría de estos tumores contienen mutaciones APC y la frecuencia global de mutaciones  $\beta$ -catenina es bajo (Samowitz WS, *et al.*, 1999). Cuando se analizaron por separado los tumores colorrectales que carecen de mutaciones APC, la probabilidad de encontrar una mutación CTNNB1 gen de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se incrementó en gran medida (Sparks AB *et al.*, 1998).

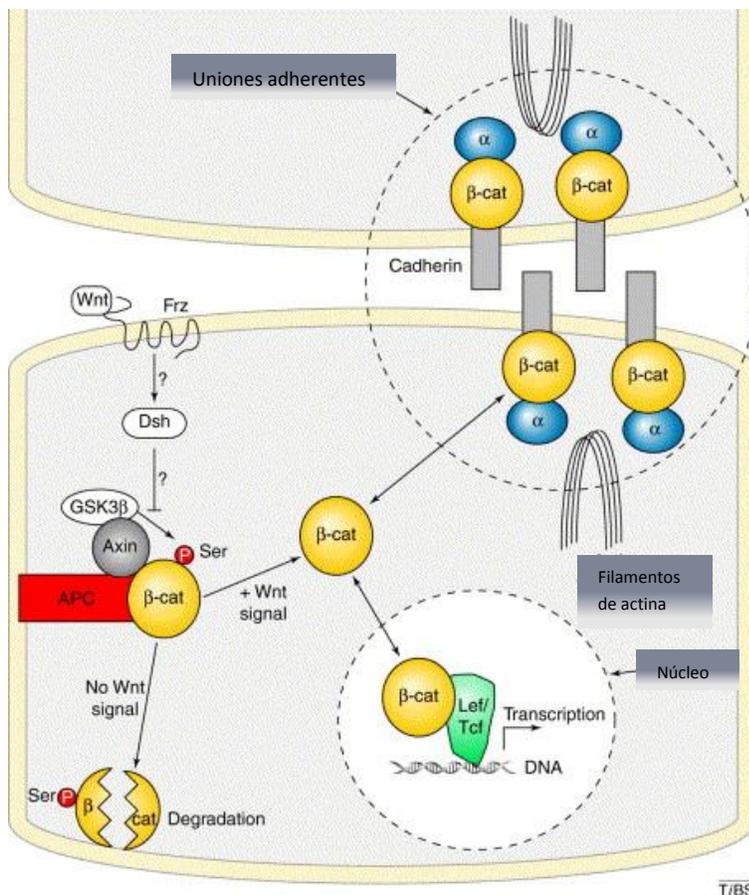


Figura 11. Participación de  $\beta$ -catenina en la adhesión celular donde forman los complejos de asociación que comunican el medio extracelular con el citoesqueleto de actina. Los niveles de  $\beta$ -catenina son regulados por la vía de señalización Frizzled, donde se desencadena la degradación de  $\beta$ -catenina por el proteosoma (Daniels DL *et al.* 2001).

## Planteamiento del problema y Justificación

El Cáncer Cérvico-Uterino es una patología que se presenta de manera frecuente en la población femenina y está asociado principalmente con la infección por virus de papiloma humano de alto riesgo. La teoría de las CSC indica que estas células sobreviven a las terapias convencionales utilizadas para el cáncer, y esto provoca la recurrencia de los tumores. En la búsqueda de terapias específicas dirigidas hacia las CSC se han encontrado perfiles específicos en varios tipos de cáncer como en leucemia mieloide aguda que presenta un fenotipo  $CD34^+/CD38^-$ , para cáncer de mama un pool de antígenos de superficie  $CD44^+/CD24^{-/low}/LIN^-$  y para cáncer próstata se ha establecido el fenotipo  $CD44^+/integrin\alpha2\beta1/CD133^+$ . Para CaCU aún no se ha definido este fenotipo, aunque existen antecedentes de Santiago en 2012 que propone a p63, CK17 y anexina II como posibles marcadores de CSC de cérvix.

De igual forma se tienen reportes de un aumento de la expresión de OCT-4, SOX-2, Nanog,  $\beta$ -catenina entre otros en CSC, por lo que se han considerado como marcadores de troncalidad en células tumorigénicas. Es por esto que en el presente trabajo se hizo el estudio de la presencia de OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina en cultivos enriquecidos de células troncales a partir de líneas celulares de Cáncer Cérvico-Uterino.

## Hipótesis

Si la formación de cervoesferas enriquece la población de CSC, entonces se observará un incremento de los marcadores de troncalidad OCT-4, SOX-2 y Nanog, necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado y auto-renovación.

Dado que la vía de señalización de Wnt- $\beta$ -catenina es relevante para la auto-renovación de las células troncales; se observará un incremento de la expresión de  $\beta$ -catenina en esferas generadas a partir de líneas celulares de CaCU.

### **Objetivo general**

- Evaluar el estado de troncalidad en cultivos enriquecidos de CSC de CaCU, a través de los marcadores OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina y evaluar la tumorigenicidad de las cervoesferas.

### **Objetivos específicos.**

- Evaluar la expresión de las proteínas OCT-4, SOX-2, Nanog, y  $\beta$ -catenina, en cultivos en monocapa de las líneas HeLa, SiHa, NCCIT, HaCat y en cultivos en esfera creadas a partir de las líneas celulares HeLa y SiHa, por citometría de flujo.
- Realizar el análisis de la expresión de OCT-4, SOX-2, Nanog, y  $\beta$ -catenina en esferas de CaCU en comparación con su contraparte en monocapa.
- Evaluar la tumorigenicidad de las Cervoesferas a través de su inoculación en ratones desnudos.

## **Metodología**

### **Cultivo celular**

Se utilizaron dos líneas celulares que contienen el virus de VPH, HeLa y SiHa. La línea celular HeLa proviene de un adenocarcinoma de cérvix humano y contiene el virus de papiloma humano tipo 18 (VPH-18) mientras que la línea celular SiHa se originó de un carcinoma escamoso de cérvix humano que contiene el virus de papiloma humano tipo 16 (VPH-16). También se utilizó como control positivo de expresión la línea celular NCCIT que pertenece a un teratocarcinoma y son células en estadio de pluripotencia y la línea celular HaCaT que son queratinocitos no tumorigénicos de piel histológicamente normales e inmortalizados.

Para los cultivos en monocapa de las líneas celulares HeLa, SiHa y HaCaT se mantuvieron en medio DMEM (Gibco BRL NY, USA) y la línea celular NCCIT en medio RPMI (Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino, GIBCO BRL NY, USA) y 100 U/mL de penicilina-100 µg/mL de estreptomina (Gibco BRL NY, USA), en condiciones de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 70% de humedad.

### **Cultivos en esfera.**

Se hicieron ensayos de formación de esferas para las líneas celulares HeLa y SiHa. Los ensayos se realizaron a partir del cultivo en monocapa con 70% de confluencia. Las células se tripsinizaron (EDTA al 0.05% en PBS), se lavaron con PBS y posteriormente se sembraron  $2 \times 10^3$  células/mL, en medio basal MammoCult® (Humano) (STEMCELL TECHNOLOGIES) suplementado con 0.0004% de Heparina (STEMCELL TECHNOLOGIES), 0.48 mg/mL de Hidrocortisona (STEMCELL TECHNOLOGIES), como remplazo del SFB 10% de suplemento de Proliferación MammoCult® (Humano) (STEMCELL TECHNOLOGIES) y 100 U/mL de penicilina-100 µg/mL de estreptomina (STEMCELL TECHNOLOGIES), en placas de 6 pozos de ultra baja adherencia (STEMCELL TECHNOLOGIES), en condiciones de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 70% de humedad.

## Citometría de flujo

Después de diez días del cultivo de las esferas de HeLa y SiHa fueron recolectadas las cervoesferas, se dejó sedimentar por 10 min y disgregadas mecánicamente en 1 mL de PBS. Para las células crecidas en monocapa HeLa, SiHa, NCCIT y HaCaT se utilizó 2 mL de verseno para desprender las células de la placa, se lavaron con 2 mL de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min ( $r= 11.5$  cm.)

Una vez obtenido el botón celular se evaluó la expresión de las proteínas OCT-4, SOX-2, Nanog, y  $\beta$ -catenina. Se adicionó 200  $\mu$ L de metanol para permeabilizar. Después de 30 min en hielo, las células se lavaron una vez con 3 mL de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min ( $r=11.5$  cm). Se adicionó una dilución 1:20 del anticuerpo específico para la detección de la proteína de interés en buffer de citometría (Albumina 0.5%, EDTA 2 mM, PBS 1x/pH 7.2), OCT-4 (Santa Cruz Biotechnology, SC5279), SOX-2 (Santa Cruz Biotechnology, SC20088), Nanog (Santa Cruz Biotechnology, SC134218),  $\beta$ -catenina (ebioscience, 14-2567-82), las células y el anticuerpo se incubaron 15 min a Temperatura ambiente y 15 min en hielo, posteriormente las células se lavaron con 200  $\mu$ L de buffer de citometría y centrifugadas a 2500 rpm 5 min ( $R=11.5$  cm).

Posteriormente para las muestras de OCT-4, Nanog y  $\beta$ -catenina se adicionó el anticuerpo secundario monoclonal anti-mouse marcado con isotocianato de fluoresceína (FICT) (Vector, Laboratories) en una dilución 1:200, incubando durante 30 min en hielo. Posteriormente las células se lavaron con 200  $\mu$ L buffer de citometría, y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min ( $r=11.5$  cm). Para SOX-2 se adicionó el anticuerpo secundario anti-rabbit, incubando durante 30 min en hielo, se lavó 200  $\mu$ L con buffer de citometría, y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Finalmente cada muestra se fijó con 300  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% en PBS.

Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo FAScan, Becton Dickinson. Para el análisis de los datos se utilizó el programa BD Cell Quest Pro. Cada experimento se hizo por duplicado.

## Ensayo de tumorigenicidad

Después de diez del cultivo se recolectaron las cervoesferas de HeLa y SiHa, se sedimentaron por 10 min y fueron disgregadas mecánicamente.

Las células fueron contadas, lavadas con PBS y se resuspendieron en medio DEMEM libre de SFB. Posteriormente se inocularon vía subcutánea en ratones desnudos nu/nu (carentes de timo) de 5 a 8 semanas de edad (obtenidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán). Se inocularon 5 ratones por condición, con  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células obtenidas de los medios enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas de CaCU, tanto para la línea celular HeLa como para SiHa, al igual se inocularon 5 ratones por condición de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células crecidas en monocapa de HeLa y SiHa. Los ratones fueron mantenidos en condiciones óptimas en el bioterio del Instituto Nacional de Cancerología durante dos meses después de la inoculación.

# Resultados de cultivo

Las líneas celulares HeLa, SiHa, HaCaT y NCCIT (Figura 12) se utilizaron como modelos de estudio para evaluar la presencia de células troncales cancerosas evaluadas durante el desarrollo de esta Tesis. Las líneas celulares HeLa y SiHa son de Cáncer Cervico-Uterino, HaCaT es una línea de piel normal inmortalizada y NCCIT un teratocarcinoma (células pluripotentes), la cual se utilizó como control positivo.

## Cultivos en monocapa

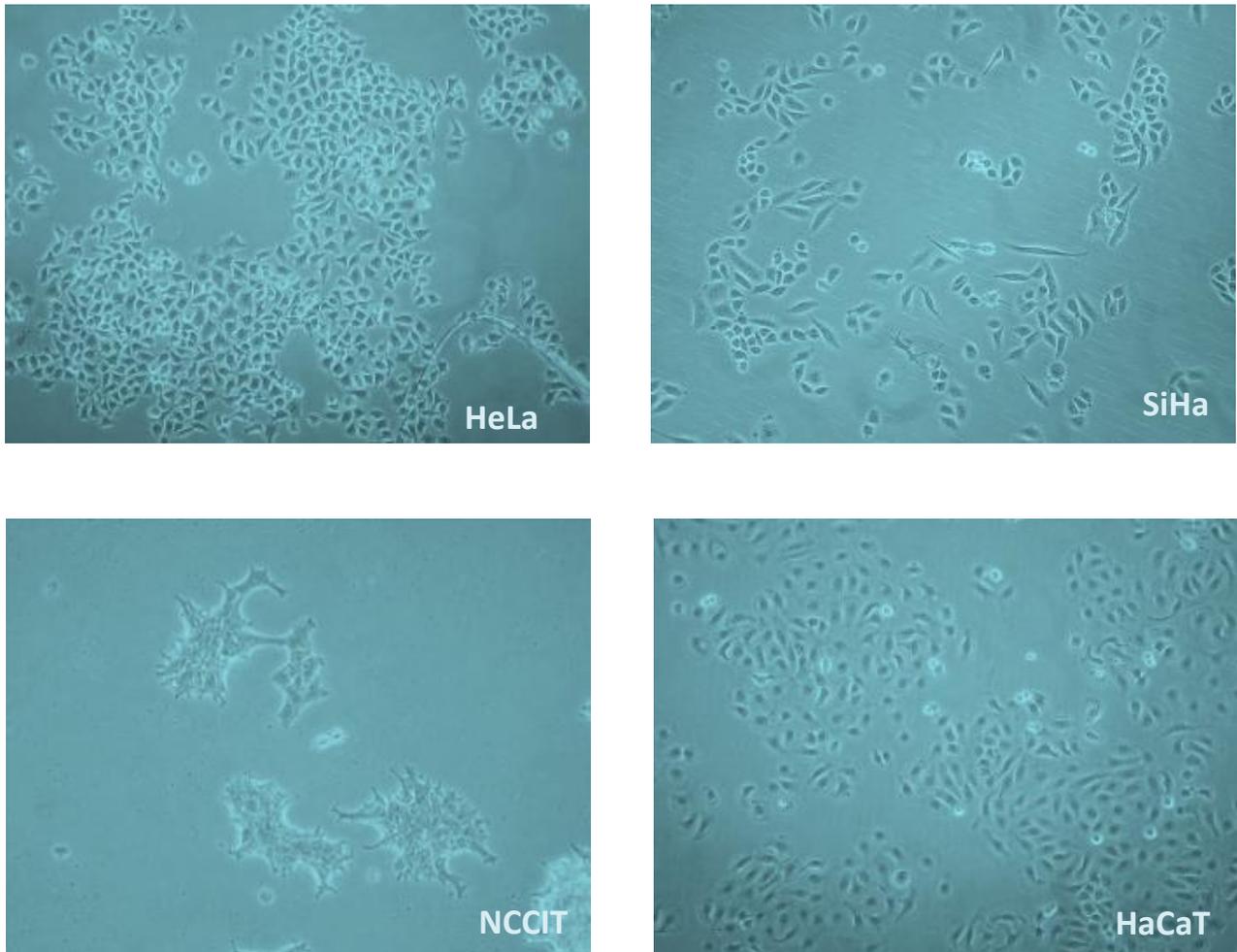


Figura 12. Se observan las líneas celulares HeLa, SiHa, NCCIT y HaCaT en un 70% de confluencia, a partir de las cuales se realizaron los cultivos en esfera.

## Cultivos en esfera de HeLa

A partir de la línea celular HeLa se sembraron  $2 \times 10^3$  células/mL en medio MammoCult® obtuvieron cultivos enriquecidos en células troncales y se colectaron a los diez días de incubación (figura 13).

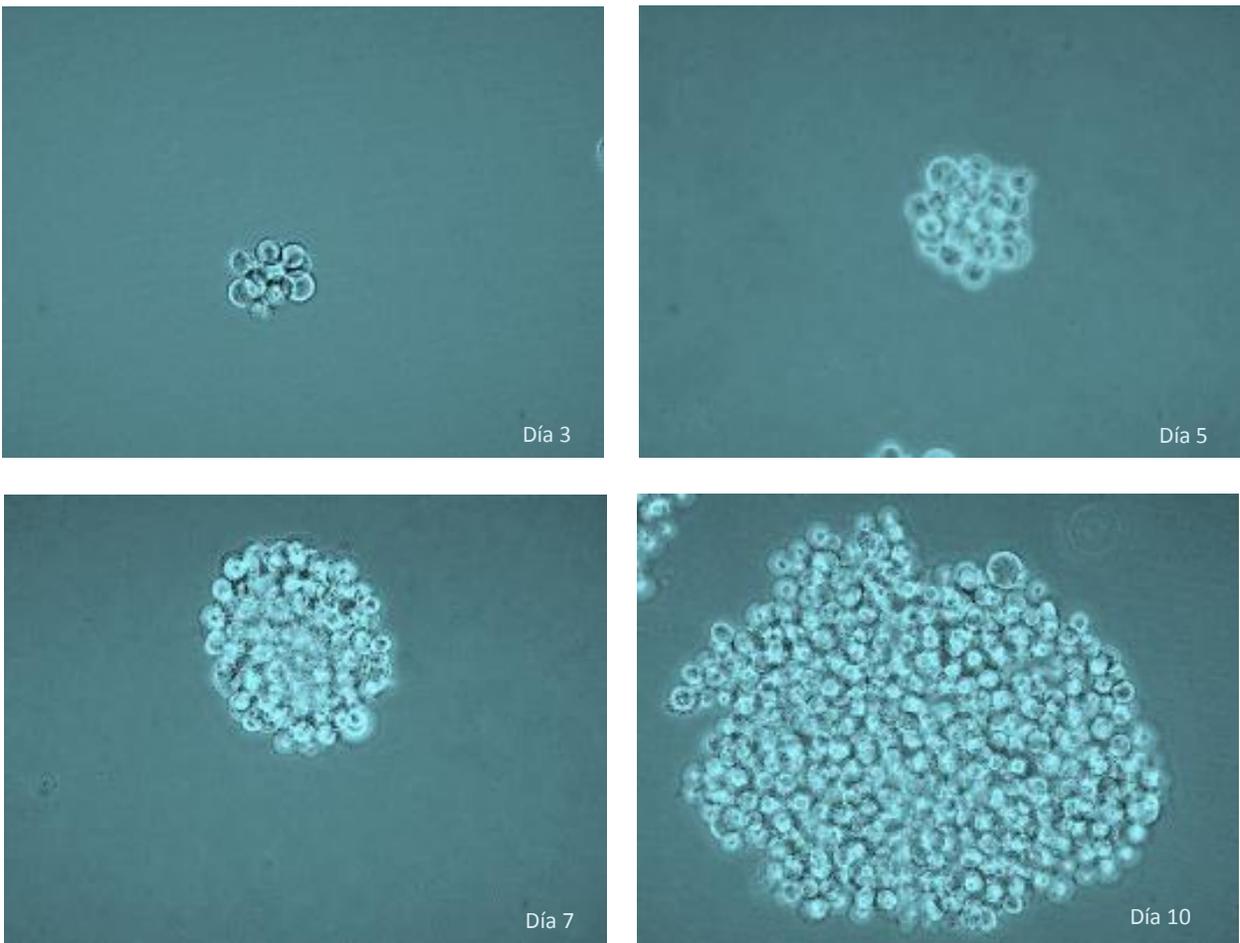


Figura 13. Se observa el crecimiento de las esferas de HeLa a través de los días.

## Cultivos en esfera de SiHa

A partir de la línea celular SiHa se sembraron  $2 \times 10^3$  células/mL en medio MammoCult® obtuvieron cultivos enriquecidos en células troncales y se colectaron a los diez días de incubación (figura 14).

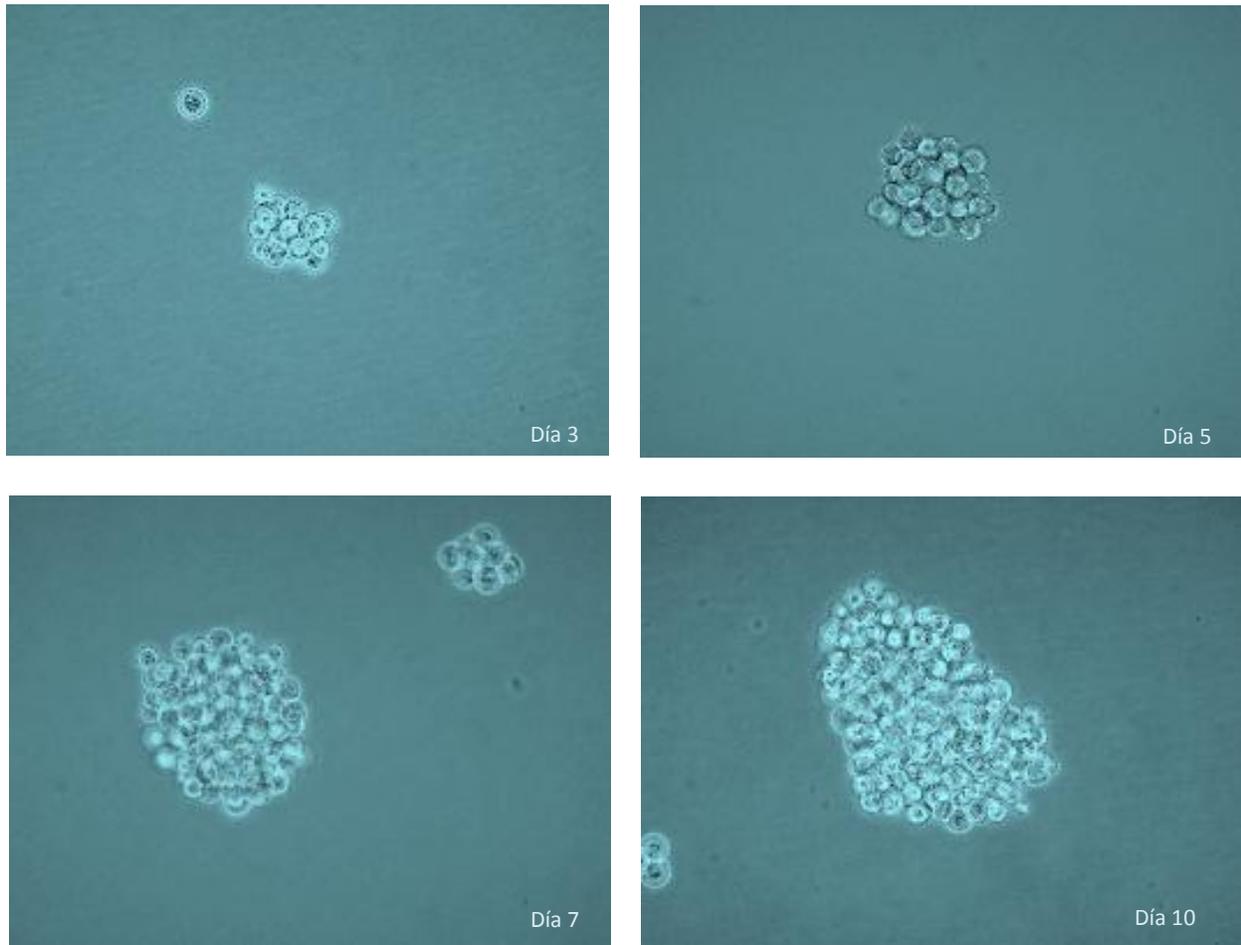


Figura 14. Se observa el crecimiento de las esferas de SiHa a través de los días.

# Resultados de citometría

Después de diez días de incubación se disgregaron mecánicamente las cervoesferas de HeLa y de SiHa. Las células de HeLa, SiHa, NCCIT y HaCaT crecidas en monocapa se desprendieron con tripsina 0.05%. Posteriormente se evaluó por citometría de flujo la expresión de OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina (Figuras 15-26). En estas figuras podemos observar dos tipos de gráfico, Dot Plot (Gráfico en donde cada punto representa un evento o célula) e histogramas en negro (isotipo: control) y en color la proteína de interés (azul OCT-4; morado SOX-2; rosa Nanog; azul claro  $\beta$ -catenina).

A través del análisis de los Dot Plot, en donde vemos granularidad (SSC) y tamaño (FSC) se pueden observar la formación de sub-poblaciones celulares (Gated: R1, R2, R3 y R4) que se consideraron para su análisis individual para cada uno de los marcadores evaluados. En los histogramas se muestra el % de células/Gated que se movió a la derecha con respecto al Isotipo. Y en las tablas observamos la media de fluorescencia o Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) expresadas/Gated.

En las Figuras 15, 16 y 17 se observa la expresión de OCT-4 en HeLa y SiHa tanto para esferas como para monocapa, así como NCCIT y HaCaT. En los histogramas observamos que tanto las cervoesferas como las cuatro monocapas expresan OCT-4. Además la media de fluorescencia (mean) nos indica un incremento de las unidades relativas de fluorescencia (URF) en la sub-población R3 de las cervoesferas tanto de HeLa (Figura 16) como de SiHa (Figura 17), encontrando en esta última una sub-población (R4) no observada en monocapa. En la línea celular NCCIT se observa mayor una positividad, lo que nos confirma que esta línea celular contiene células pluripotentes. En HaCaT observamos un comportamiento similar a las monocapas de HeLa y SiHa que se analizará en la sección de discusión.

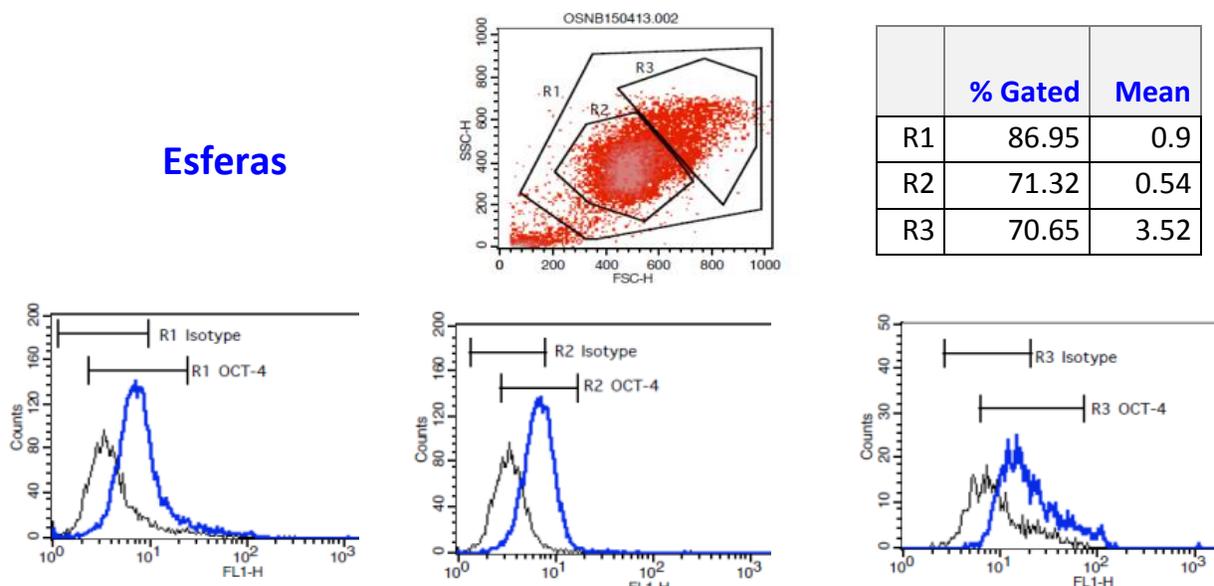
En las Figuras 18, 19 y 20 se muestra la expresión de SOX-2 en HeLa y SiHa tanto para esferas como para monocapa, así como NCCIT y HaCaT. Para esta proteína observamos positividad solo en las cervoesferas y no en las monocapas. En donde vemos poca expresión solo en la sub-población R3 de las esferas de HeLa (Figura 18) y en la sub-población R4 de las esferas de SiHa (Figura 19). En NCCIT y HaCaT no se observa la expresión de SOX-2 (Figura 20).

En las Figuras 21, 22 y 23 se muestran los histogramas de la expresión de Nanog en HeLa y SiHa tanto para esferas como para monocapa, así como HaCaT y NCCIT. Se observa desplazamiento a la derecha en los histogramas de las esferas de HeLa y se observa que la media de fluorescencia (mean) en la sub-población R3 de las esferas es alta (Figura 21). En las Cerveoesferas de SiHa vemos que el desplazamiento del histograma en rosa es muy marcado con respecto a su contraparte en monocapa y adicional a esto en la sub-población R4 el desplazamiento es muy evidente observando así una media de fluorescencia muy alta en comparación con OCT-4 y SOX-2 (Figura 22). En el caso del control positivo NCCIT observamos que estas células están expresando una media de fluorescencia alta, lo que nos corrobora la pluripotencia de estas células. Y en HaCaT observamos que está expresando a Nanog en menor grado comparativo a las monocapas HeLa y SiHa.

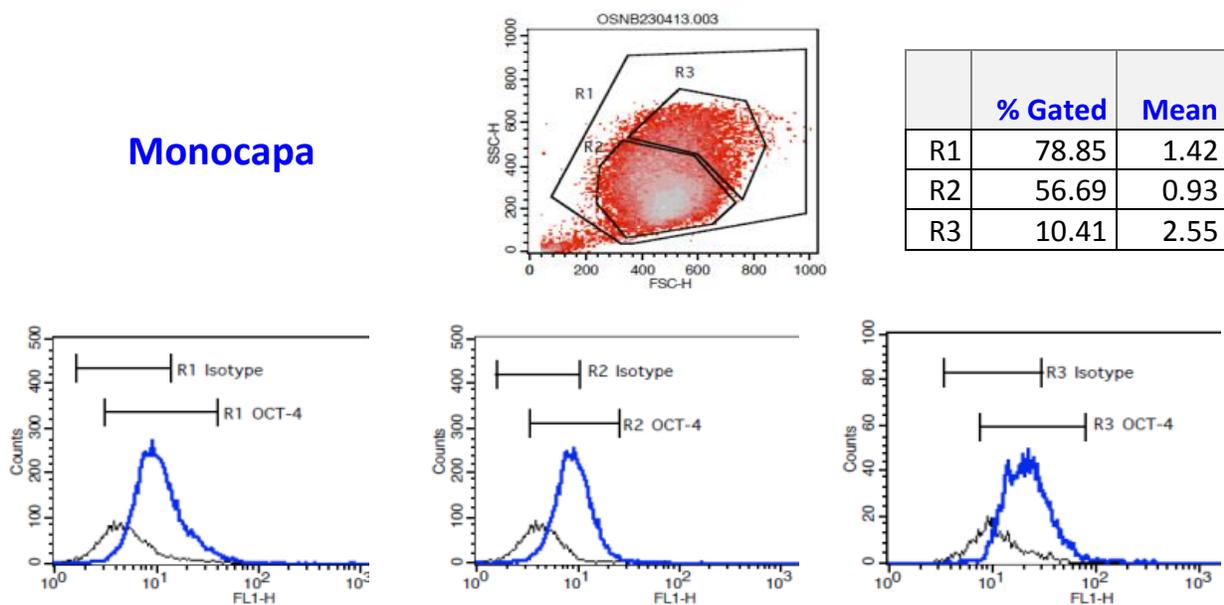
En las Figuras 24, 25 y 26 se observan los histogramas de la expresión de  $\beta$ -catenina en las cervoesferas y monocapas de HeLa y SiHa, así como para NCCIT y HaCaT. Para esta proteína observamos que en las monocapas de HeLa y SiHa el desplazamiento del histograma es mayor que en las Cerveoesferas, sin embargo en las sub-poblaciones R3 de esferas de HeLa y R4 de esferas de SiHa observamos una expresión positiva con respecto a sus contrapartes en monocapa. Para las líneas celulares NCCIT y HaCaT observamos un desplazamiento marcado al igual que una media de fluorescencia muy alta en la sub-población R3 para ambas líneas.

# OCT-4 en HeLa

## Esferas



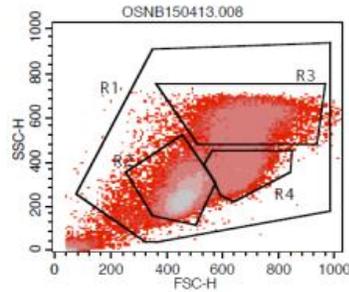
## Monocapa



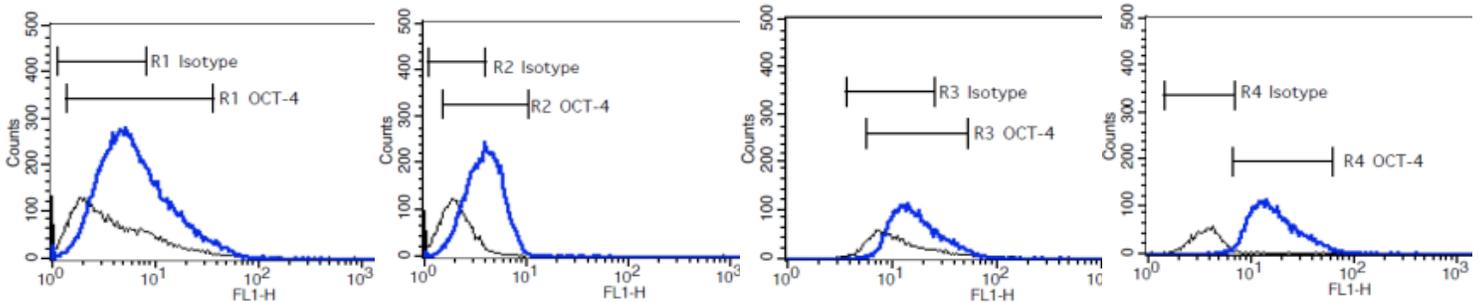
**Figura 15.** Detección de la proteína OCT-4 en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular HeLa por citometría de flujo. La línea en azul indica la fluorescencia proporcional de OCT-4 en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# OCT-4 en SiHa

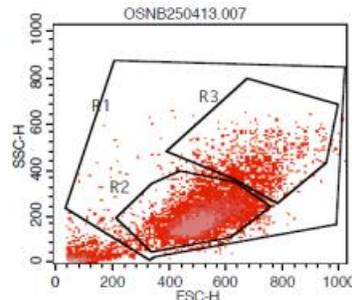
## Esferas



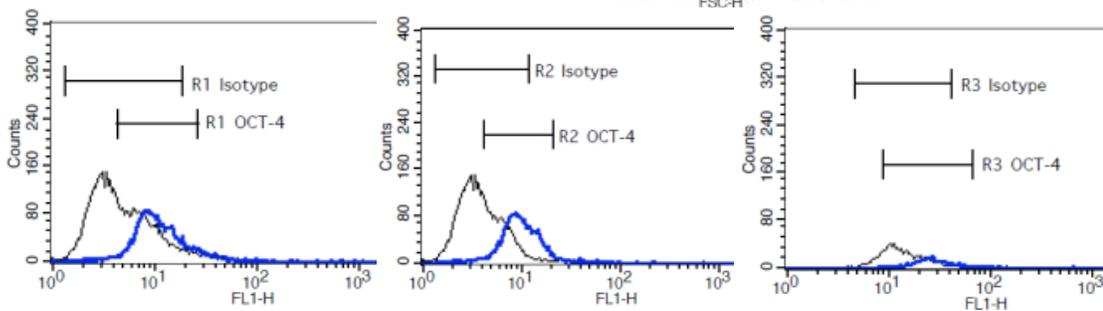
	% Gated	Mean
R1	93.42	2.32
R2	83.53	0.21
R3	90.44	2.7
R4	1.25	6.23



## Monocapa

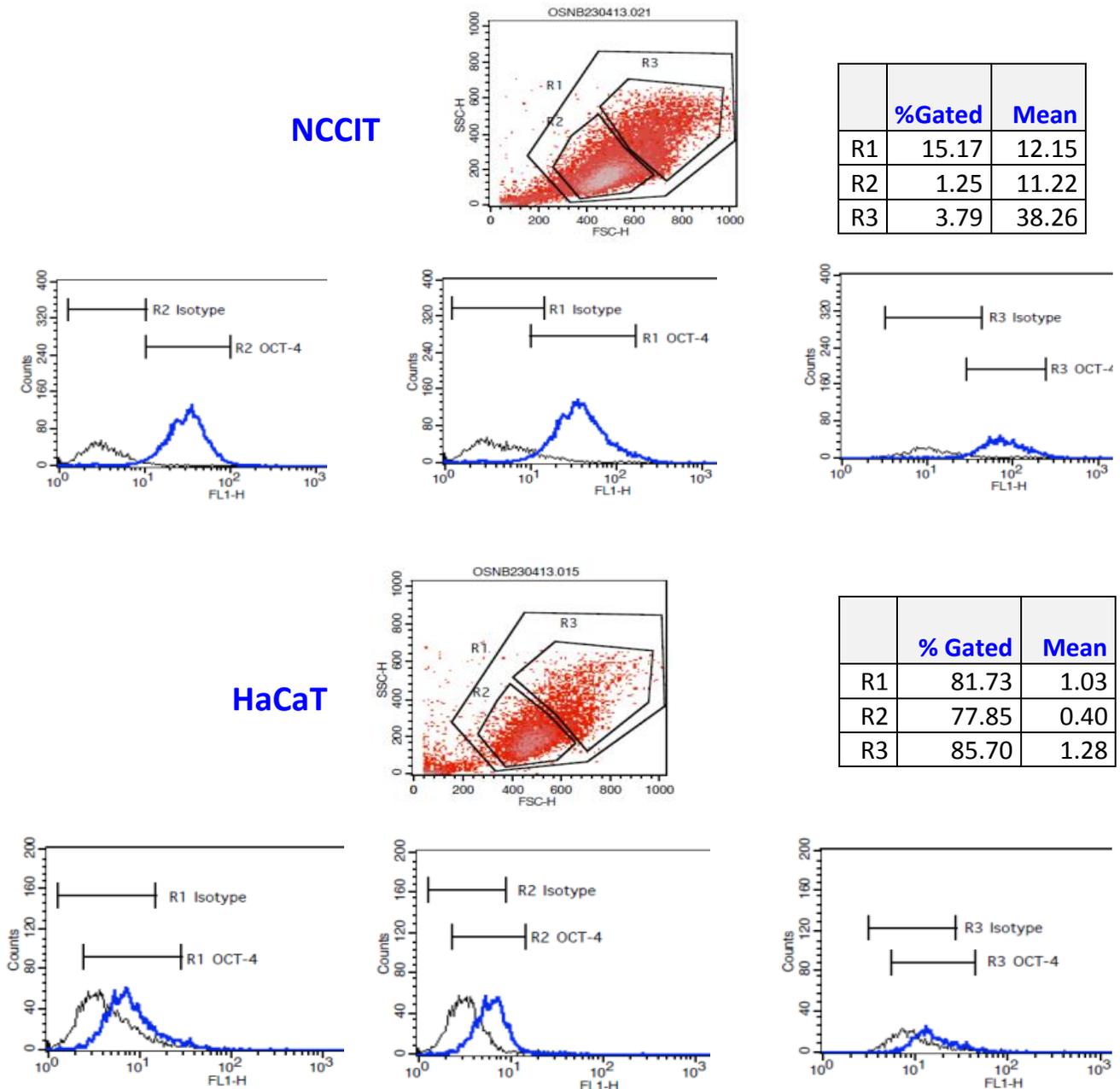


	% Gated	Mean
R1	45.71	3.47
R2	37.58	0.23
R3	82.01	2.17



**Figura 16.** Detección de la proteína OCT-4 en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular SiHa por citometría de flujo. La línea en azul indica la fluorescencia proporcional de OCT-4 en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

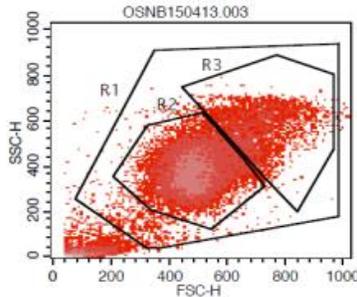
# OCT-4 en NCCIT y HaCaT



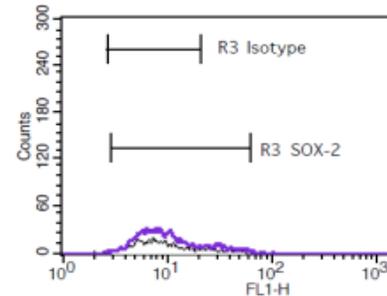
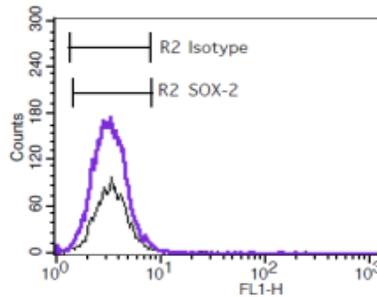
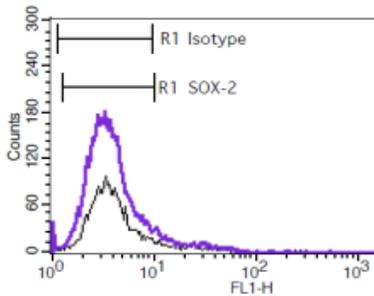
**Figura 17.** Detección de la proteína OCT-4 en las líneas celulares NCCIT y HaCaT. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# SOX-2 en HeLa

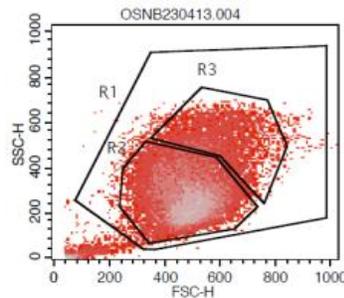
## Esferas



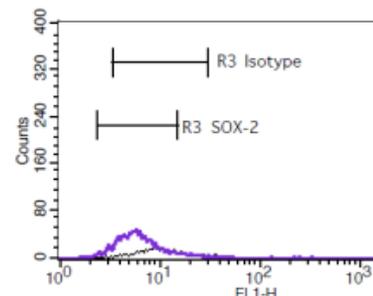
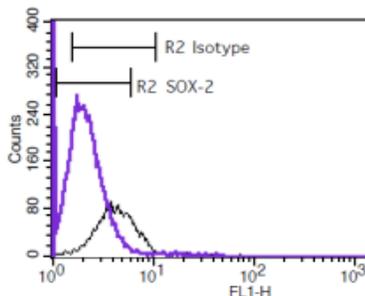
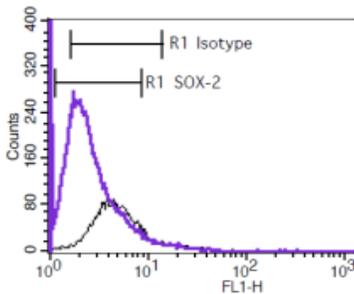
	%Gated	Mean
R1	77.78	0.04
R2	98.70	0.02
R3	99.38	0.03



## Monocapa



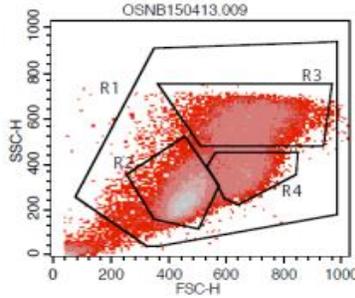
	%Gated	Mean
R1	86.19	0
R2	80.11	0
R3	79.75	0



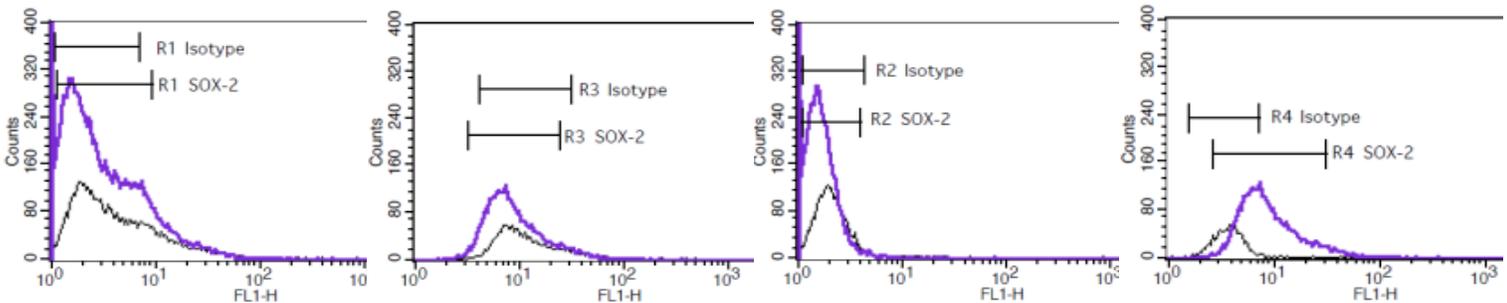
**Figura 18.** Detección de la proteína SOX-2 en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular HeLa por citometría de flujo. La línea en morado indica la fluorescencia proporcional de SOX-2 en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# SOX-2 en SiHa

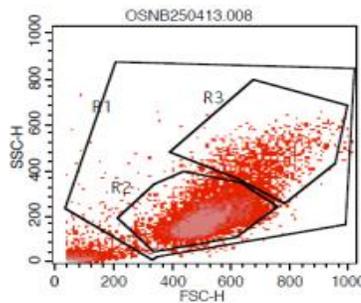
## Esferas



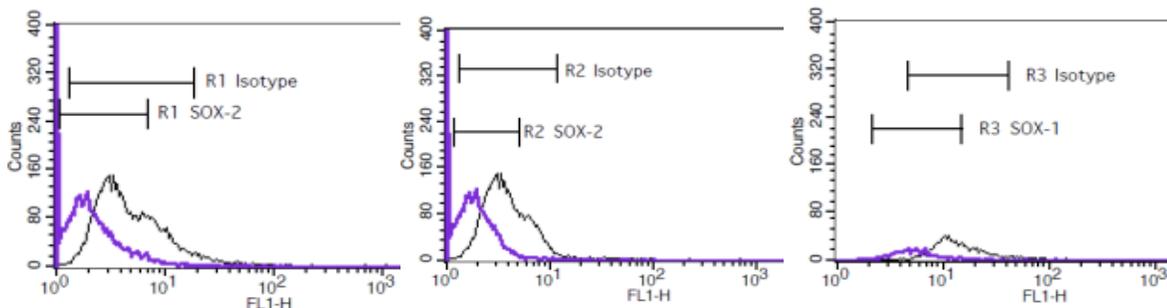
	%Gated	Mean
R1	82.47	0.5
R2	95.87	0
R3	89.63	0
R4	87.20	0.26



## Monocapa



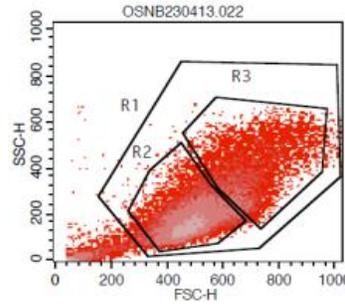
	%Gated	Mean
R1	74.05	0
R2	73.35	0
R3	68.11	0



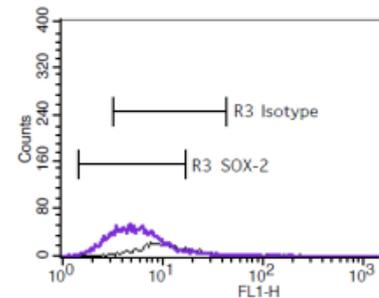
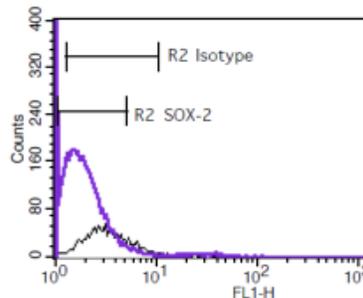
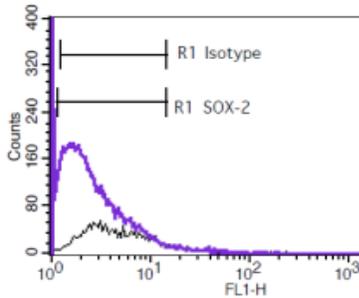
**Figura 19.** Detección de la proteína SOX-2 en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular SiHa por citometría de flujo. La línea en morado indica la fluorescencia proporcional de SOX-2 en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# SOX-2 en NCCIT HaCaT

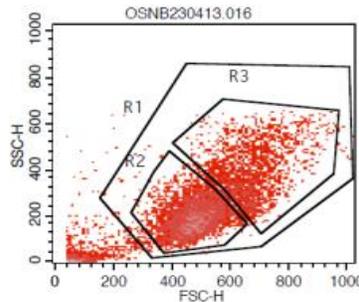
## NCCIT



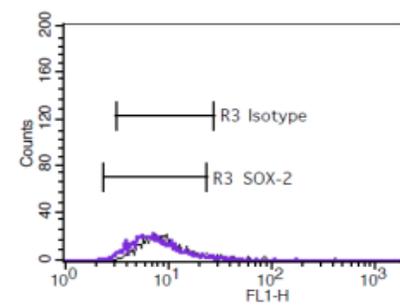
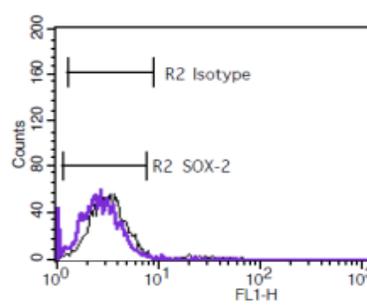
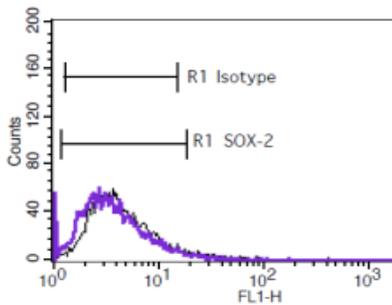
	%Gated	Mean
R1	92.52	0
R2	81.92	0
R3	83.50	0



## HaCaT



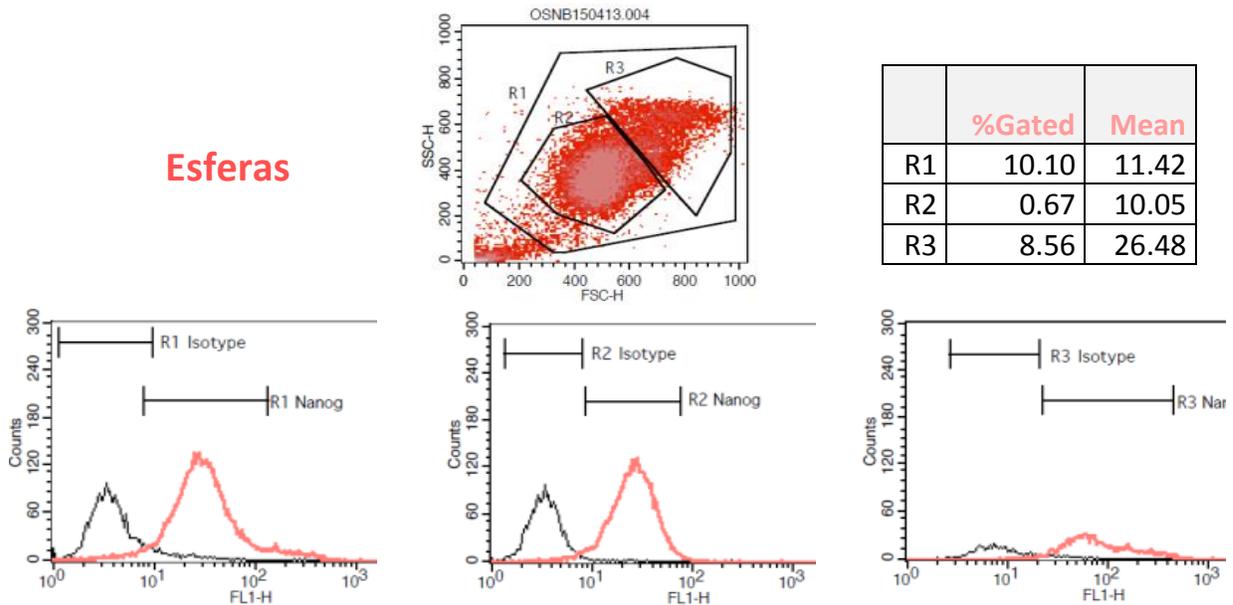
	%Gated	Mean
R1	97.25	0
R2	97.54	0
R3	96.55	0



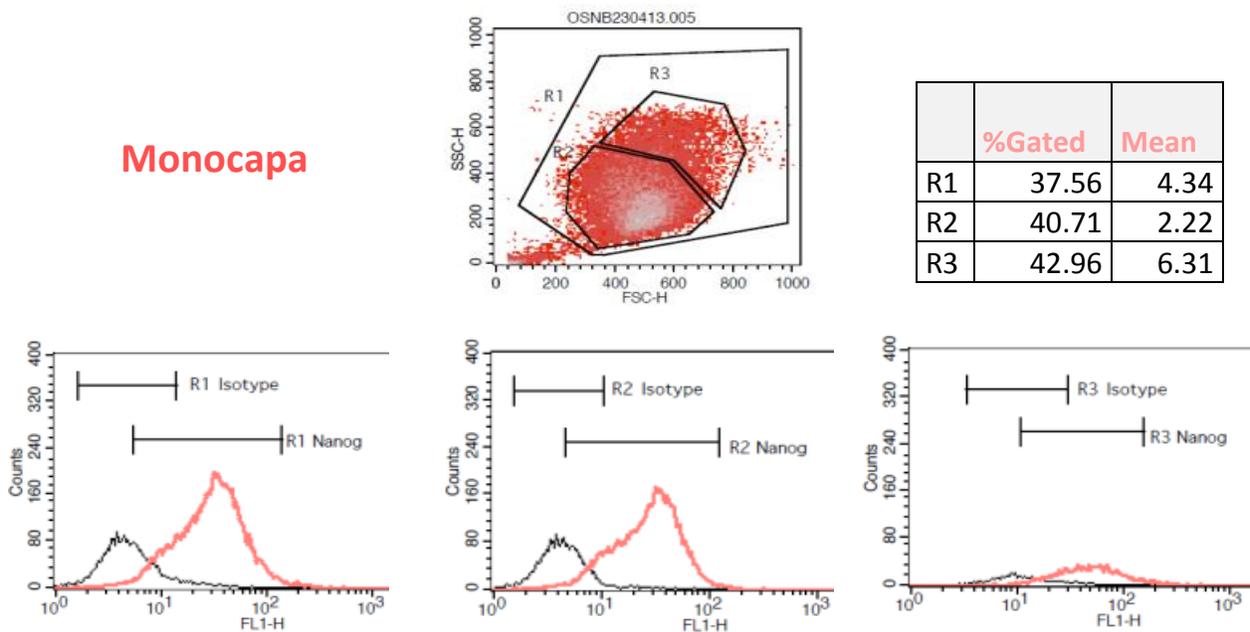
**Figura 20.** Detección de la proteína SOX-2 en las líneas celulares NCCIT y HaCaT por citometría de flujo. La línea en morado indica la fluorescencia de SOX-2. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# Nanog en HeLa

## Esferas



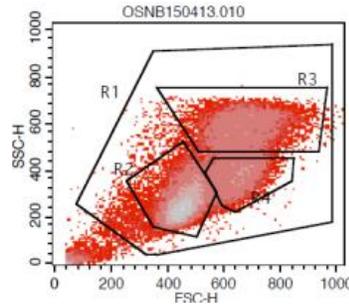
## Monocapa



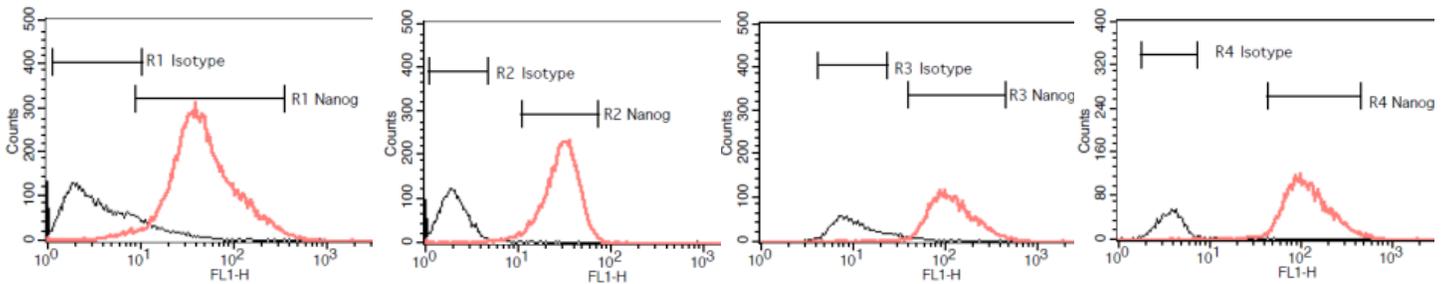
**Figura 21.** Detección de la proteína Nanog en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular HeLa por citometría de flujo. La línea en rosa indica la fluorescencia proporcional de Nanog en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# Nanog en SiHa

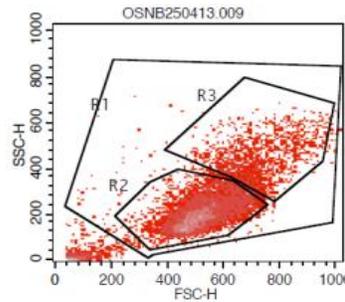
## Esferas



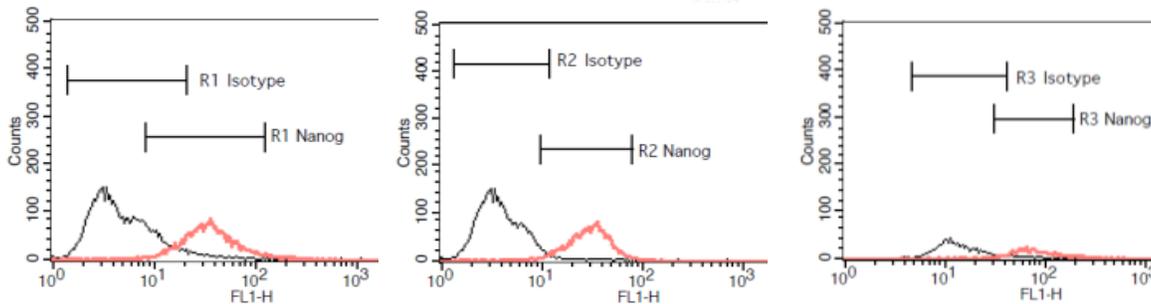
	%Gated	Mean
R1	99.96	23.86
R2	0.11	18.42
R3	3.26	45.84
R4	0.03	46.25



## Monocapa

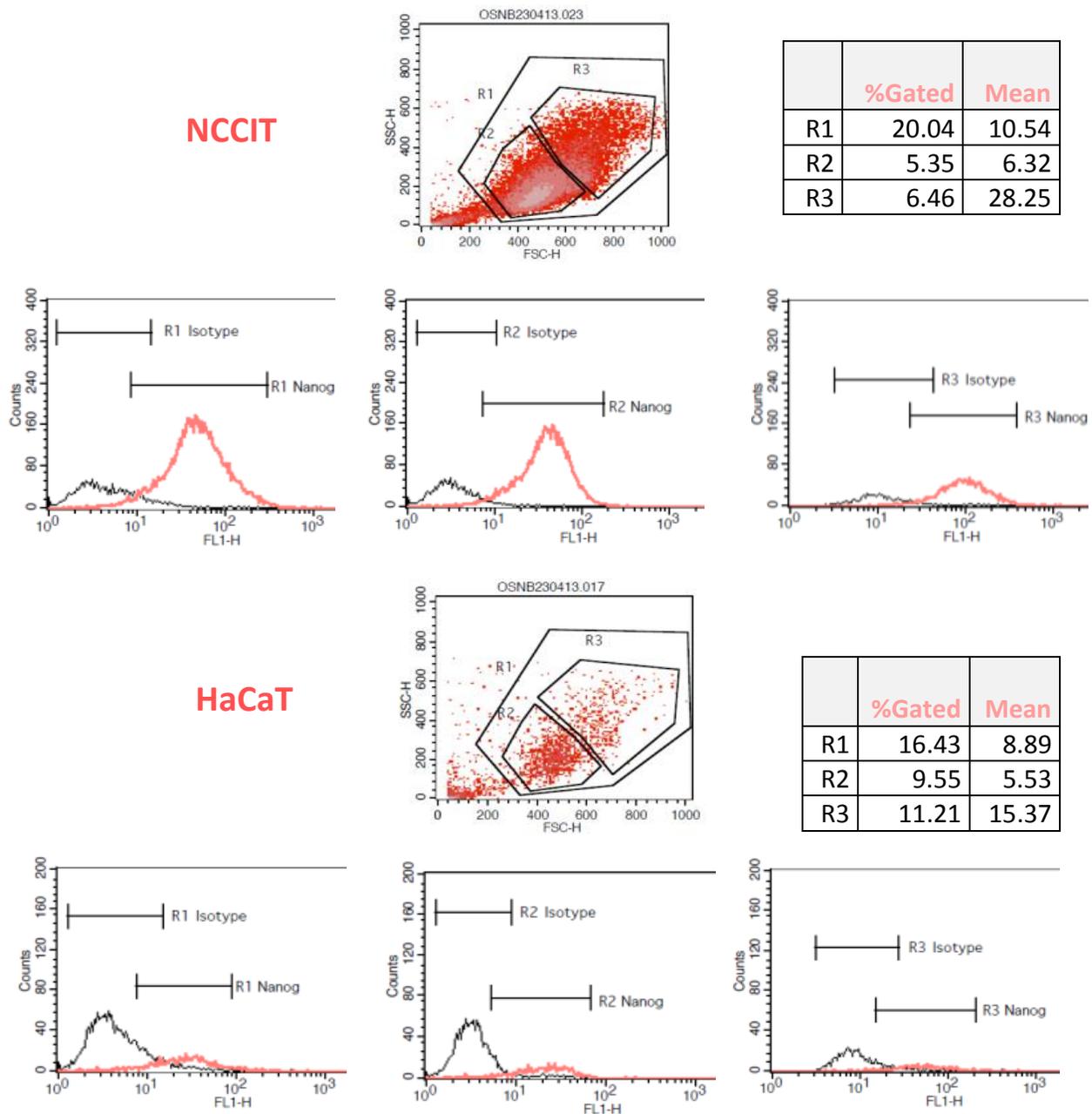


	%Gated	Mean
R1	20.11	9.46
R2	2.82	10.92
R3	4.68	30.71



**Figura 22.** Detección de la proteína Nanog en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular SiHa por citometría de flujo. La línea en rosa indica la fluorescencia proporcional de Nanog en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

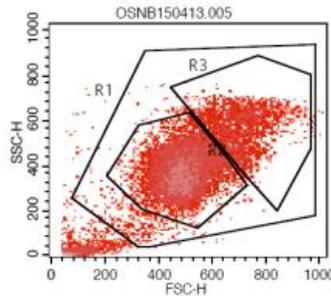
# Nanog en NCCIT y HaCaT



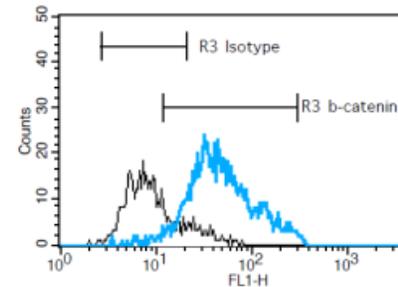
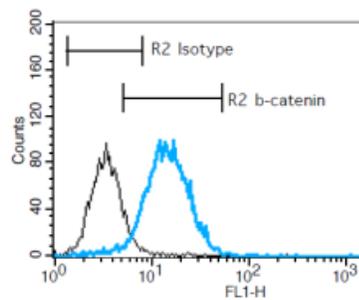
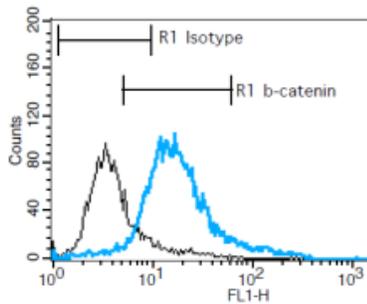
**Figura 23.** Detección de la proteína Nanog en las líneas celulares HaCaT y NCCIT por citometría de flujo. La línea en rosa indica la fluorescencia Nanog en las líneas celulares HaCaT y NCCIT. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# $\beta$ -catenina en HeLa

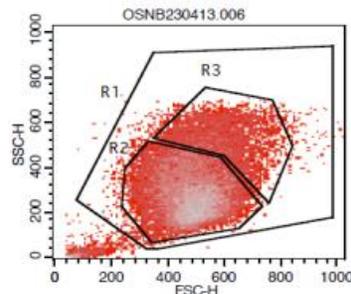
## Esferas



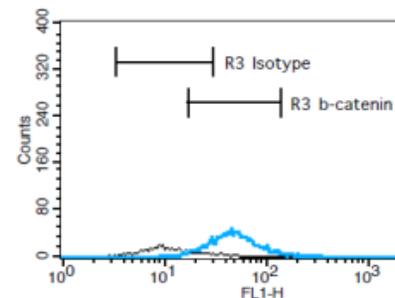
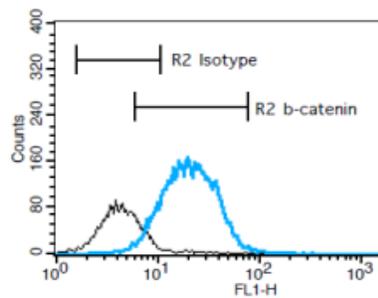
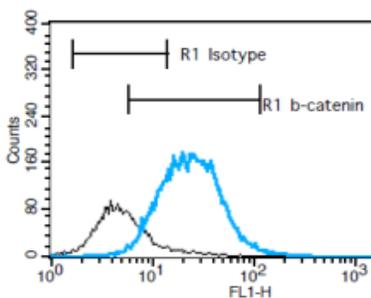
	%Gated	Mean
R1	24.55	5.81
R2	10.14	2.93
R3	23.34	14.48



## Monocapa



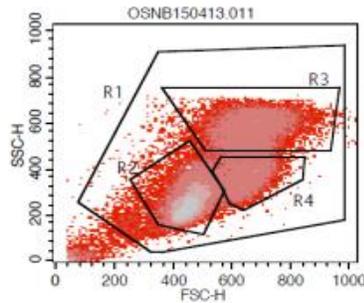
	%Gated	Mean
R1	34.56	4.68
R2	20.68	3.67
R3	15.86	13.64



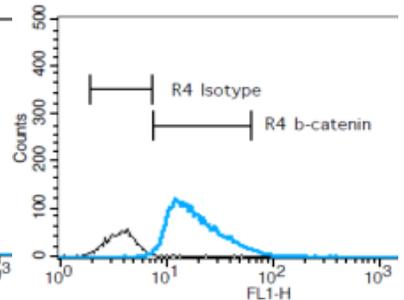
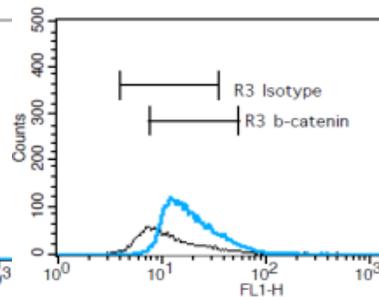
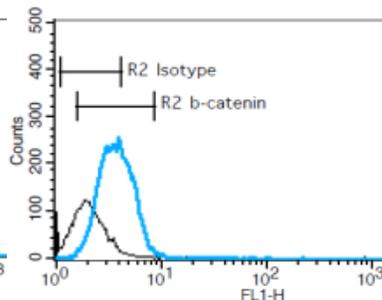
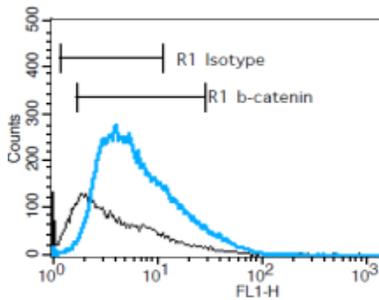
**Figura 24.** Detección de la proteína  $\beta$ -catenina en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular HeLa por citometría de flujo. La línea en azul indica la fluorescencia proporcional de  $\beta$ -catenina en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# $\beta$ -catenina en SiHa

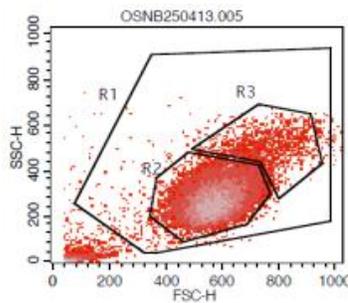
## Esferas



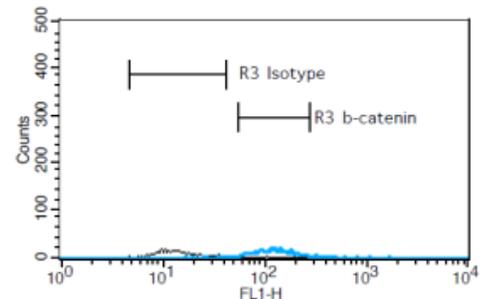
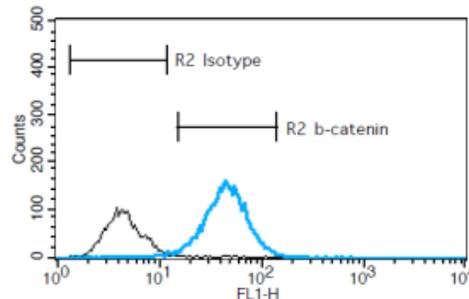
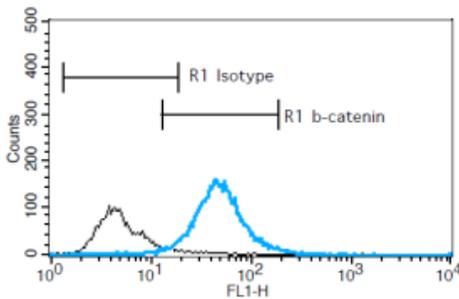
	%Gated	Mean
R1	83.15	1.89
R2	79.18	0.23
R3	70.20	3.65
R4	0.52	10.21



## Monocapa

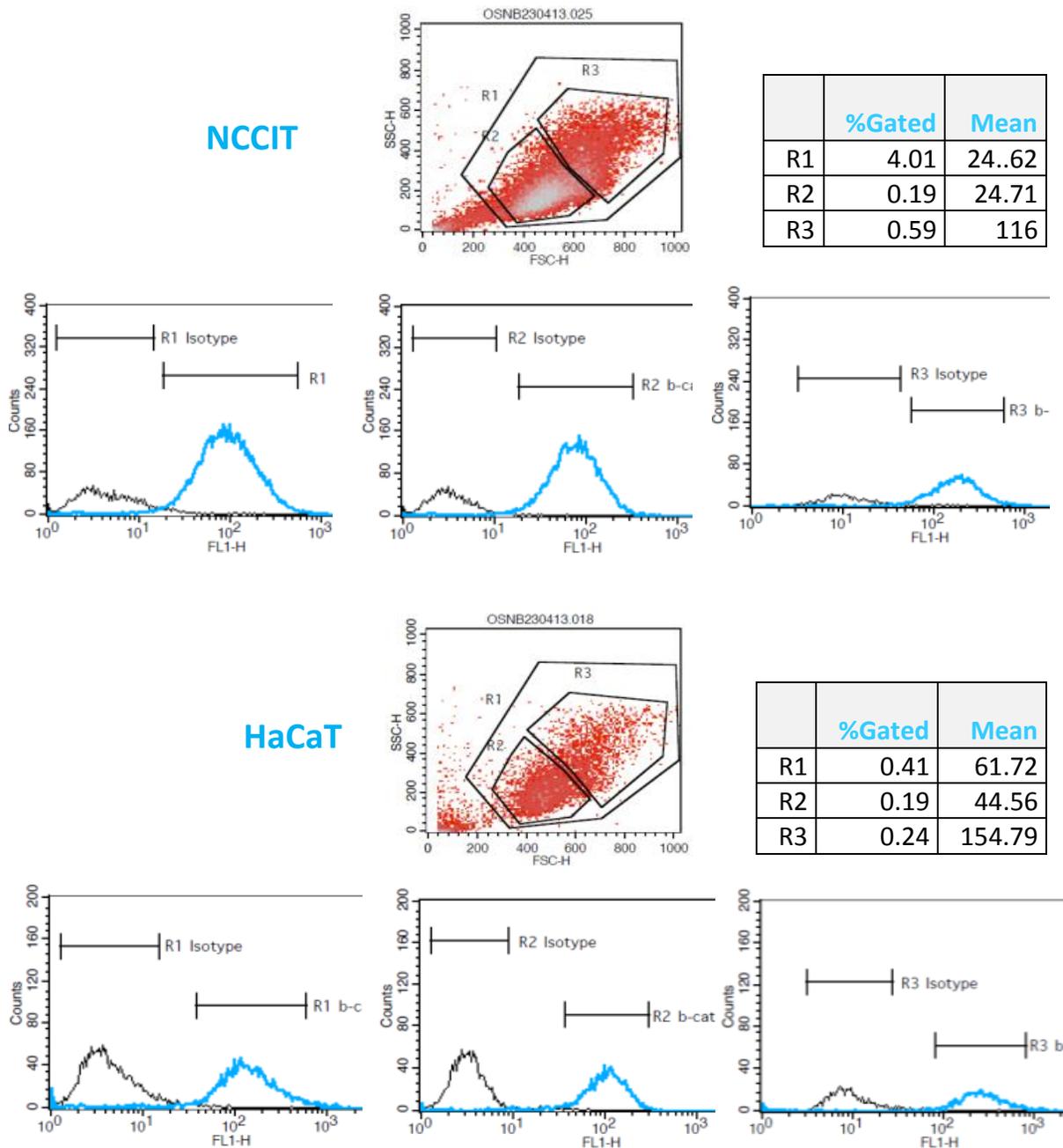


	%Gated	Mean
R1	5.47	15.37
R2	0.34	28.52
R3	0.12	89.68



**Figura 25.** Detección de la proteína  $\beta$ -catenina en esferas y su contraparte en monocapa de la línea celular SiHa por citometría de flujo. La línea en azul indica la fluorescencia proporcional de  $\beta$ -catenina en esferas y en monocapa. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# $\beta$ -catenina en NCCIT y HaCaT



**Figura 26.** Detección de la proteína  $\beta$ -catenina en las líneas celulares HaCaT y NCCIT por citometría de flujo. La línea en azul indica la fluorescencia proporcional de  $\beta$ -catenina en las líneas celulares HaCaT y NCCIT. La línea en negro muestra la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario. Se grabaron 10 000 eventos por muestra. A la derecha se muestra el % del Gated y la media de fluorescencia, que muestra el nivel de expresión de las unidades relativas de fluorescencia (URF).

# Tablas de citometría

## OCT-4

		% Gated	Mean	% Gated	Mean
		Esferas		Monocapa	
HeLa	R1	86.95	0.9	78.85	1.42
	R2	71.32	0.54	56.69	0.93
	R3	70.65	3.52	10.41	2.55
SiHa	R1	93.42	2.32	45.71	3.47
	R2	83.53	0.21	37.58	0.23
	R3	90.44	2.7	82.01	2.17
	R4	1.25	6.23		
Controles		NCCIT		HaCaT	
	R1	15.17	12.15	81.73	1.03
	R2	1.25	11.22	77.85	0.4
	R3	3.79	38.26	85.7	1.28

**Tabla 1.** Se muestra el porcentaje de células positivas a OCT-4 en cada región (%Gated) y la media de fluorescencia expresada por cada región. La media de fluorescencia se expresa como Unidades relativas de fluorescencia (URF). Cada URF mostrado es la resta de URF-problema menos URF-Anticuerpo secundario.

## SOX-2

		%Gated	Mean	%Gated	Mean
		Esferas		Monocapa	
HeLa	R1	77.78	0.04	86.19	0
	R2	98.7	0.02	80.11	0
	R3	99.38	0.03	79.75	0
SiHa	R1	82.47	0.5	74.05	0
	R2	95.87	0	73.35	0
	R3	89.63	0	68.11	0
	R4	87.2	0.26		
Controles		NCCIT		HaCaT	
	R1	92.52	0	97.25	0
	R2	81.92	0	97.54	0
	R3	83.5	0	96.55	0

**Tabla 1.** Se muestra el porcentaje de células positivas a SOX-2 en cada región (%Gated) y la media de fluorescencia expresada por cada región. La media de fluorescencia se expresa como Unidades relativas de fluorescencia (URF). Cada URF mostrado es la resta de URF-problema menos URF-Anticuerpo secundario.

## Nanog

		%Gated	Mean	%Gated	Mean
		<b>Esferas</b>		<b>Monocapa</b>	
HeLa	R1	10.1	11.42	37.56	4.34
	R2	0.67	10.05	40.71	2.22
	R3	8.56	26.48	42.96	6.31
SiHa	R1	99.96	23.86	20.11	9.46
	R2	0.11	18.42	2.82	10.92
	R3	3.26	45.84	4.68	30.71
	R4	0.03	46.25		
Controles		<b>NCCIT</b>		<b>HaCaT</b>	
	R1	20.04	10.54	16.43	8.89
	R2	5.35	6.32	9.55	5.53
	R3	6.46	28.25	11.21	15.37

**Tabla 1.** Se muestra el porcentaje de células positivas a Nanog en cada región (%Gated) y la media de fluorescencia expresada por cada región. La media de fluorescencia se expresa como Unidades relativas de fluorescencia (URF). Cada URF mostrado es la resta de URF-problema menos URF-Anticuerpo secundario.

## $\beta$ -catenina

		%Gated	Mean	%Gated	Mean
		<b>Esferas</b>		<b>Monocapa</b>	
HeLa	R1	24.55	5.81	34.56	4.68
	R2	10.14	2.93	20.68	3.67
	R3	23.34	14.48	15.86	13.64
SiHa	R1	83.15	1.89	5.47	15.37
	R2	79.18	0.23	0.34	28.52
	R3	70.2	3.65	0.12	89.68
	R4	0.52	10.21		
Controles		<b>NCCIT</b>		<b>HaCaT</b>	
	R1	4.01	24.62	0.41	61.72
	R2	0.19	24.71	0.19	44.56
	R3	0.59	116	0.24	154.8

**Tabla 1.** Se muestra el porcentaje de células positivas a  $\beta$ -catenina en cada región (%Gated) y la media de fluorescencia expresada por cada región. La media de fluorescencia se expresa como Unidades relativas de fluorescencia (URF). Cada URF mostrado es la resta de URF-problema menos URF-Anticuerpo secundario.

# Resultados de tumorigenicidad

Para conocer el potencial tumoral de las cervoesferas. Después de siete días de incubación, se disgregaron e inocularon en ratones *nu/nu* de 5 a 8 semanas de edad. En la Figura 27 se muestra un ratón 3 semanas post-inoculación (imagen izquierda) y el tumor obtenido del ratón sacrificado (imagen derecha). En la Tabla 5 se muestra que  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^2$  células obtenidas de las cervoesferas de HeLa y de SiHa forman tumor 20 y 30 días post-inoculación respectivamente. Particularmente, cuando se inocularon 500 000 células de monocapa, se observó el desarrollo de tumor después de 60 días post-inoculación.



**Figura 27.** Desarrollo de tumor 3 semanas post-inoculación de esferas de 7 días (cultivo homogeneizado).

	HeLa monocapa	Cervoesferas HeLa	SiHa monocapa	Cervoesferas SiHa
$1 \times 10^3$	0/5	0/5	0/5	0/5
$1 \times 10^4$	0/5	5/5	0/5	4/5*
$1 \times 10^5$	0/5***	5/5**	0/5	5/5**

**Tabla 5.** Ensayo de tumorigenicidad de las cervoesferas de HeLa y SiHa en ratones desnudos *nu/nu*.

\*El crecimiento del tumor fue evidente 30 días post-inoculación.

\*\* El crecimiento del tumor fue evidente 3 semanas post-inoculación.

\*\*\* Después de 60 días de inoculación, 1/5 ratones mostraron crecimiento tumoral.

## Discusión

La búsqueda de estrategias en contra del cáncer y la inespecificidad de las terapias actuales para eliminar a las CSC (población capaz de reiniciar tumor, resistente a fármacos y capaz de desarrollar estrategias de sobrevivencia) promueve nuestro interés por estudiar a las CSC. En la presente tesis se evaluó la presencia de los marcadores de troncalidad OCT-4, SOX-2 y Nanog en un modelo de enriquecimiento de CSC de CaCU (Cervoesferas), de forma adicional se evaluó la expresión de la proteína  $\beta$ -catenina en Cervoesferas como un marcador de la activación de la vía de Wnt. Esta vía de señalización está implicada en los procesos de auto-renovación de las CSC.

El modelo de cultivo de esferas, es una metodología *in vitro* que nos permite evaluar poblaciones enriquecidas de CSC. Este modelo representa ventajas en comparación con modelos *in vivo*: mantienen la heterogeneidad celular, son células que se mantienen en constante proliferación, cada esferoide contiene células clonales provenientes de una sola célula troncal, por lo que se han utilizado como modelo para la evaluación de estrategias contra el cáncer. A través de ensayos de mammoesferas se demostró la capacidad de las CSC cultivadas *in vitro* para generar los tres linajes de células mamarias, por lo que lo hace un modelo idóneo para el estudio de las células de mama normales y cancerosas (Ponti D *et al.*, 2005).

Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo muestran un incremento de CK-17, p63 y Anexina II en cultivos de esferas, sugiriendo a estas proteínas como posibles marcadores fenotípicos de las CSC de CaCU (Santiago LL, 2012). Dando continuidad a este trabajo se decidió determinar la expresión de los factores de transcripción responsables del mantenimiento del estado indiferenciado y de auto-renovación OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina en cervoesferas, todo como parte de la caracterización de estos cultivos enriquecidos en CSC de CaCU.

Además se ha visto que las células troncales y las CSC comparten numerosas propiedades biológicas. Algunas de estas características son la auto-renovación, y el potencial de diferenciarse a diferentes tipos celulares, por esta razón es importante estudiar las diferentes proteínas relacionadas con la troncalidad, entre los genes que codifican para este tipo de proteínas encontramos a los factores de transcripción OCT-4, SOX-2 y Nanog, de los cuales se sabe que regulan la auto-renovación y la diferenciación de las células troncales embrionarias. Se ha demostrado la expresión desregulada de estos factores en diferentes tipos de tumor, sugiriendo su importancia en el desarrollo de la tumorigenesis al contribuir a la formación de una neoplasia.

OCT-4 es el factor de transcripción más estudiado en cuanto a pluripotencia y auto-renovación en células troncales embrionarias, en las cuales se ha encontrado expresado en altos niveles, aunque interesantemente OCT-4 se encuentra expresado también en diferentes tipos de tumor tales como en melanoma, colón, mama, próstata, entre otros (Strizzi L *et al.*, 2008). Por esta razón es importante estudiar su expresión en células cancerosas de cérvix. Se sabe que OCT-4 interactúa con otros factores de transcripción para activar y reprimir la expresión de genes en células ES de ratón (Pesce M and Scholer HR, 2001). Los miembros de la familia FOX están fuertemente implicados en la diferenciación de células embrionarias tempranas, sobre todo en el desarrollo hacia endodermo (Hromas R and Costa, 1995). FoxD3, activa a FoxA1 y FoxA2, que al igual pertenecen a la familia FOX, son necesarios para el desarrollo embrionario del endodermo hacia órganos del intestino anterior (Guo Y *et al.*, 2002). Guo y colaboradores muestran que OCT-4 reprime la expresión de FoxA1 y FoxA2 través de la interacción con el dominio de unión de ADN de su activador FoxD3.

OCT-4 también actúa junto con otros factores de transcripción, por ejemplo la regulación de FGF4, que es un factor de crecimiento específico de células troncales y se encuentra dentro la región no traducida 3' del gen K-FGF (Curatola AM and Basilico C, 1990). Este potenciador contiene un motivo octamérico adyacente a un sitio de unión a la que OCT-4 y SOX-2 se unen cooperativamente para activar una transcripción sinérgica (Yuan H *et al.*, 1995). En ausencia de SOX-2, OCT-4 no puede activar el promotor de FGF4 (Ambroseti *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa la presencia de la proteína OCT-4 en la población total de HeLa. Al comparar el nivel de detección de OCT-4 observamos que se expresa más en monocapa que en esferas, pero de manera interesante se encontró que hay una sub-población (R3) en las esferas que tiene una media de fluorescencia mayor, es decir, expresa una Unidad Relativa de Fluorescencia (URF) más que en monocapa (Figura 15). En el caso de SiHa hay una pequeña sub-población que representa el 1.25 % de la población total expresando 6.25 URF, esta sub-población no la vemos en monocapa (Figura 16). Es importante destacar que esta sub-población al presentar más OCT-4 que monocapa podría representar exclusivamente a las células troncales cancerosas de CaCU, puesto que la literatura dice que las CSC son una pequeña población dentro de la población heterogénea de un tumor. Para el control positivo se observó que en NCCIT la expresión de URF fue de 38.26 lo que nos da la certeza de que son células pluripotentes y la importancia de la expresión de OCT-4 en estas células, y para HaCaT la expresión de OCT-4 es de 1.28 URF (Figura 17) lo que nos sugiere que esta proteína podría tener un papel importante en células no tumorigénicas.

Estudios previos en células ES de ratón demuestran que SOX-2 y OCT-4 interactúan sinérgicamente para activar la transcripción de sus genes blanco (Remenyi A *et al.*, 2004). Estos factores de transcripción regulan una red de genes implicados en la embriogénesis, tales como Lefty, FGF-4, Nanog, UTF, FBX y DPPA4 (Chakravarthy H *et al.*, 2008). Por ensayos de micro-arreglos se identificó un conjunto de más de 300 genes que son regulados por SOX-2 y OCT-4 en células ES (Boyer LA *et al.*, 2005).

En un ensayo evaluado por Citometría de flujo, líneas celulares de CaCU fueron transfectadas con pSOX-2/EGFP y se observó que células HeLa no expresan SOX-2 y en SiHa se observa una mayor expresión (Xiao-Fang L *et al.*, 2014). En el presente trabajo SOX-2 no se encuentra expresado en ninguno de los tipos celulares estudiados. Sin embargo es importante resaltar que en la sub-población R4 en las esferas de SiHa muestra positividad para SOX-2 con una URF de 0.26 (figura 19). La positividad de SOX-2 en R4 sugiere que en esta sub-población encontramos a las CSC de cérvix, al igual porque representa el mismo cuadrante en donde se observó la sub-población que expresa a OCT-4. La diferencia de expresión de SOX-2 en las cervoesferas HeLa y SiHa posiblemente se deba a que son líneas celulares de diferente origen, una con adenocarcinoma (HeLa) y la otra de un carcinoma escamoso (SiHa).

Nanog es un regulador esencial en el desarrollo temprano de células ES (Chambers *et al.*, 2003). OCT-4, SOX-2 y Nanog cooperan para mantener el fenotipo de célula troncal, la auto-renovación y la pluripotencia de células ES. Los estudios previos de Nanog en tumores sugieren el potencial y la importancia que tiene en la regulación en el desarrollo de tumores. En otros estudios se observó sobre-expresión en los niveles de ARNm de Nanog en tres líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, T-47D y MDA-MB-231), en este mismo estudio a través de inmunotinción de las mammoesferas se observó a las células positivas a Nanog, y ellos sugieren que Nanog se expresa sólo en un pequeño subconjunto de las células cancerosas, que pudieran ser las CSC de mama.

En el presente estudio para Nanog en la población total de esferas de HeLa, el 10% expresa 11.42 URF en comparación con el 37.56% de monocapa que expresa solo 4.34 URF, en una sub-población que representa el 8.56% expresa 26.48 URF y su análogo en monocapa que es 42% de células expresa solo 6.31 URF (Figura 21). En la línea celular SiHa en la población total la diferencia entre esferas y monocapa es muy marcada, se observa que en la población total hay una expresión de 23.86 URF y en monocapa solo 9.46 URF, además se observa una sub-población que no encontramos en monocapa que representa el 0.03% de esferas y que expresa 46.25 URF (Figura 22), estos datos sugieren que esta pequeña población de células y que están expresando una cantidad muy grande de la proteína, podrían ser las CSC de cérvix, teniendo la posibilidad de que pudiera ser la misma sub-población que está expresando a OCT-4 y a SOX-2. Para el control positivo NCCIT de expresión solo una fracción de la población expresa 28.25 URF, mucho menos de lo que se ve en esferas de SiHa y comparativamente con las esferas de HeLa el valor es similar (Figura 23). Para HaCaT se observa que hay una población que expresa 15.7 URF, lo que es muy relevante ya que esta proteína Nanog también tiene un papel importante en células no tumorigénicas.

Por otra parte se ha demostrado que la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina contribuye al mantenimiento de la pluripotencia en células ES (Wagner *et al.*, 2010). TCF3 es un factor de transcripción ligado a las mismas regiones de OCT-4 y Nanog, lo que sugiere que la proteína Tcf3 que está implicado en la pérdida de la pluripotencia celular (Guo G *et al.*, 2011). Otros estudios sugieren que Tcf3 limita la capacidad de Nanog y OCT-4 para activar genes diana que promueven la auto-renovación, este mismo estudio por medio de siRNAs nos indica que Tcf3 y OCT-4 regulan directamente los mismos genes diana (Yi F *et al.*, 2008). Faunes F. (2013) y colaboradores confirman que  $\beta$ -catenina contribuye a la pluripotencia antagonizando Tcf3.

A través de citometría de flujo, nosotros observamos que  $\beta$ -catenina presenta una mayor expresión en monocapa que en la población total de esferas de HeLa, lo que es reproducible con resultados de Gutiérrez (grupo de trabajo) por Western blot. Sin embargo existe una sub-población de esferas que posee más  $\beta$ -catenina que en monocapa. Esta sub-población presente en las esferas de HeLa que pudiera ser la misma que está expresando a OCT-4, SOX-2 y Nanog, refuerza la idea de que pudieran ser las CSC de cérvix, además de sugerir la importancia de  $\beta$ -catenina en procesos tumorigénicos (Figura 24).

En el caso de SiHa se observa que en monocapa hay mucha más expresión que en esferas, sin embargo es importante remarcar que aparece la misma sub-población que está expresando a OCT-4, SOX-2 y Nanog, y que no está representada en monocapa, lo que nos sugiere nuevamente estar representando a las CSC de cérvix, además de sugerir un papel importante de  $\beta$ -catenina en el proceso tumorigénico (Figura 25). Para el control positivo NCCIT se ve que el 0.59% de la población total expresa 116.07 URF, lo que nos sugiere que  $\beta$ -catenina tiene un papel importante en las células pluripotentes (Figura 26). Para la línea HaCaT se ve expresado 154.79 URF en tan solo 0.24% de la población total, lo que nos sugiere que al igual que OCT-4, SOX-2 y Nanog,  $\beta$ -catenina tiene un papel importante en células no tumorigénicas.

Además de los ensayos de citometría de flujo se realizó un ensayo de tumorigénesis. Es importante mencionar que las cervoesferas con las que trabajamos en el desarrollo de la presente tesis son tumorigénicas ya que hemos demostrado su capacidad para formar tumor en ratones desnudos nu/nu. Los estudios *in vivo*, mostraron la capacidad de las células provenientes de las cervoesferas (enriquecidas en CSC) inducen crecimiento tumoral, a partir de la inoculación de 1 000, 10 000 y 100 000 células. Es importante mencionar que el crecimiento del tumor fue evidente después de 30 días post-inoculación, al comparar con el control positivo en monocapa no se ha observado crecimiento con esta misma cantidad de células

En resumen, las cervoesferas que se trabajan en nuestro grupo de investigación, no solo muestran un incremento de marcadores fenotípicos, sino además poseen los marcadores OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina. Interesantemente demostramos la presencia de una pequeña sub-población dentro de las cervoesferas que contiene una mayor cantidad de los factores de transcripción OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina, por lo que podríamos sugerir que en esta sub-población están representadas las Células Troncales del Cáncer de Cérvix. Además demostramos que la inoculación de cervoesferas en distintos números da lugar a masa tumoral, lo que demuestra que estas cervoesferas son tumorigénicas.

## Conclusiones

Con la evaluación de las proteínas OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina demostramos la presencia de marcadores de troncalidad en nuestros modelos de enriquecimiento de Células Troncales Cancerosas a través de la formación de esferas derivadas de líneas celulares de CaCU.

Las cervoesferas obtenidas de HeLa y SiHa muestran poseer un mayor potencial tumorigénico que sus contrapartes crecidas en monocapa.

Los cultivos de esferas de las líneas celulares HeLa y SiHa muestran una sub-población celular con una mayor cantidad de proteína de OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina. Esta sub-población podría representar a las células troncales cancerosas dentro de las esferas.

La expresión de OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina contribuye a la caracterización de las CSC de CaCU.

## Perspectivas

Realizar citometrías de flujo de doble tinción para saber si es que es la misma sub-población la que está expresando a OCT-4, SOX-2, Nanog y  $\beta$ -catenina.

Demostrar que esta pequeña sub-población corresponde a las CSC de CaCU responsables de tumorigenicidad de las cervoesferas.

## Literatura Citada

- Ahmed Y., Hayashi S., Levine A., Wieschaus E. 1998. **Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development.** *Cell.* 93(7):1171–1182.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A. Morrison, S. J. & Clarke, M. F. 2003. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(11):3983–3988.
- Alvi A.J., Clayton H., Joshi C., Enver T., Ashworth A., Vivanco M.M., Dale T.C. and Smalley M.J. 2003. **Functional and molecular characterization of mammary side population cells.** *Breast Cancer Res.* 5:1-8.
- Ambrosetti D.C., C. Basilico C. and L. Dailey L. 1997. **Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites.** *Mol Cell Biol.* 17(11):6321-6329.
- Atlasi Y., Mowla S.J. Ziaee S.A. Gokhale P.J. and Andrews P.W. 2008. **OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells.** *Stem Cells.* 26(12):3068-3074.
- Benjamin D. Simons D. y Clevers H. 2011. **Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues.** *Cell.* 05(033) 851-862.
- Blanpain C. and Fuchs E. 2009. **Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 10:207-217.
- Boer B., Kopp J., Mallanna S., Desler M., Chakravarthy H., Wilder P.J., Bernadt C. And Rizzino A. 2007. **Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2: Oct-3/4 target genes.** *Nucleic Acids Res.* 35(6):1773-1786.
- Bouwens L. and Roman I. 2005. **Regulation pancreatic beta-cell mass.** *Physiol Rev.* 85(4):1255-1270.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R. and Young R.A. 2005. **Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.** *Cell.* 122(6):947-956.
- Cáceres Cortés J. R. 2011. **Acute Myelogenous leukemia: A perspective.** *Revista de hematología México.* 12(4):257-266.
- Cao L., Zhou Y., Zhai B., Liao J., Xu W., Li J., Chen L., Qian H., Wu M. and Yin. 2011. **Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines.** *Bio Med Central Gastroenterology.* 11:71.
- Chakravarthy H. and Rizzino A. 2009. **SOX2, Mus musculus SRY-box containing gene 2.** *Transcription Factor Encyclopedia.* 1-4.

- Chakravarthy H., Boer B., Desler M., Mallana SK., MacKeithen., Rizzino A. 2008. **Identification of DPPA4 and other genes as putative Sox2:Oct-3/4 target genes using a combination of in silico analysis and transcription-based assays.** *J Cell Physiol* 216(3):351-362.
- Chambers I., Colby D. and Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S. and Smith A. 2003. **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell*. 113(5):643-655.
- Chen J.S., Pardo F.S., Wang R. J., Chu T.S., Lopez J.P., Aguilera J., Ituna X., Weisman R.A. and Ongkeko W.M. 2006. **EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma.** *Laryngoscope*. 116(3):401-406.
- Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L. and Wahl G.M. 2006. **Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR Work shop on cancer stem cells.** *Cancer Res*. 66(19):9339-9344.
- Curatola A.M. and Basilico C. 1990. **Expression of the K-fgf proto-oncogene is controlled by 3' regulatory elements which are specific for embryonal carcinoma cells.** *Mol Cell Biol*. 10(6):2475-2484.
- Dalerba P., Cho R.W. and Clarke M.F. 2007. **Cancer Stem cells: models and concepts.** *Annu Rev Med*. 58:267-284.
- Daniels DL, Spink KE and Weis WI. 2001. **beta-catenin: molecular plasticity and drug design.** *Trends Biochem Sci*. 2001. 26(11):672-678.
- Darr H., Mayshar Y. and Benvenisty N. 2006. **Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features.** *Development*. 133(6):1193-1201.
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R. Bernard H.U. and zur Hausen H. 2004. **Classification of papillomaviruses.** *Virology*. 324(7):17-27.
- Dick J.E. 2003. **Stem cells: Self-renewal writ in blood.** *Nature*. 423:231-233.
- Dontu G., Abdallah W.M., Foley J.M., Jackson K.W., Clarke M.F., Kawamura M.J. and Wicha M.S. 2003. **In vitro propagation and transcriptional profiling mammary stem progenitor cells.** *Genes and Development*. 17(10):1253-1270.
- Doorbar J, Ely S and Sterling J. 1991. **Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network.** *Nature*. 352:824-827.
- Episkopou V. 2005. **SOX2 functions in adult neural stem cells.** *Trends Neurosci*. 28:219-221.
- Faris R.A., Konkin T. and Halpert G. 2001. **Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease.** *Artifitial Organs*. 25(7):513-521.
- Faunes F., Hayward P. and Martínez A. A. 2013. **A membrane-associated  $\beta$ -catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells.** *Development*. 140(6):1171-1183.

- Ferri A.L., Cavallaro M., Braida D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P.P., Sala M., DeBiasi S. and Nicolis S.K. 2004. **Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain.** *Development* 131(15):3805-3819.
- Franco E.L. and Rohan T.E. 2002. **Cancer precursors, Epidemiology, detection and prevention.** Springer-Verlag New York 1<sup>a</sup> ed. 430 pp.
- Gaje F.H., Ray J. and Fisher L.J. 1995. **Isolation, characterization and uso de stem cells from the CNS.** *Annual Review Neurosci.* 18: 159-192.
- Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C.G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M.S. and Dontu G. 2007. **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and predictor of poor clinical outcome.** *Cell stem Cell.* 1(5):555-567.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE and Sapp M. 2001. **Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate.** *J. Virol.* 75:1565-1570.
- Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S. and Mulligan R.C. 1996. **Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.** *J Exp Med.* 183: 1797-1806.
- Günther J. and Pedernera A. E. 2011. **E-cadherna: Pieza clave en la tranformación neoplásica.** *Rec Eviden Invest Clin.* 4 (1): 15-20.
- Guo G., Huang Y., Humphreys P., Wang X. and Smith A. 2011. **A Piggy Bac-based recessive screening method to identify pluripotency regulators.** *PLoS ONE.* 6:181-189.
- Guo Y., Costa R., Ramsey H., Starnes T., Vance G., Robertson K., Kelley M., Reinbold R., Scholer H. and Hromas R. 2002. **The embryonic stem cell transcription factors Oct4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:3663-3667.
- Haller H., de Groot K., Bahlmann F., Elger M. and Fliser D. 2005. **Stem cells and progenitor cells in renal disease.** *Kidney International.* 68:1932-1936.
- Hanahan D. and Weinberg R. A. 2011. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell.* 144:647-674.
- Hanna L. A., Foreman R. K., Tarasenko I. A. Kessler D. S. and Labosky P. A. 2002. **Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo.** *Genes Dev.* 16(20):2650-2661.
- Haraguchi N., Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Mimori K., Barnard G.F. and Mori M. 2006. **Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system.** *Stem Cells.* 24:506-513.
- Hausen H. 1982. **Human genital cancer; synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events?.** *Lancet II.* 1370–1372.

- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B. and Kinzler K.W. 1998. **Identification of c-Myc as a target of the APC pathway.** *Science*. 281:1509–1512.
- Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geswind D.H., Bronner-Fraser M. and Komblum H.I. 2003. **Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumours.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(25):15178-15183.
- Hermann P.C., Huber S. L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J. W., Guba M., Bruns C. J. and Heeschen C. 2007. **Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer.** *Cell Stem Cell*. 1:313-323.
- Hirschmann-Jax C., Foster A.E., Wulf G.G., Nuchtern J.G., Jax T.W., Gobel U., Goodell M.A. and Brenner M.K. 2004. **A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:14228-14233.
- Hope K.J., Jin L. and Dick J.E. 2004. **Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity.** *Nat Immunol*. 5:738–743.
- Hromas R. and Costa R. 1995. **The hepatocyte nuclear factor-3/forkhead transcription regulatory family in development, inflammation and neoplasia.** *Crit Rev Oncol Hematol*. 20(1-2):129-140.
- Jacques F., S.R. Hai, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin. 2010. **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International Journal of Cancer*. 127:2893-2917.
- Jordan T. C., Guzman M. L. and Noble M. M. 2006. **Cancer Stem Cells.** *The New England Journal of Medicine*. 355(12):1253-1261.
- Kemler R. 1993. **From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.** *Trends Genet*. 9(9):317-321.
- Kesavapany S., Lau K.F., McLoughlin D.M., Brownlees J., Ackerley S., Leigh P.N., Shaw C.E. and Miller C.C. 2001. **p35/cdk5 binds and phosphorylates beta-catenin and regulates betacatenin/presenilin-1 interaction.** *Eur J Neurosci*. 13:241-247.
- Kosik K.S. 1999. **A partnership that delivers.** *Nat Med*. 5(2):149-50.
- Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H, Hatano S. Y., Suemori H., Nakatsuji N. and Tada T. 2005. **Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression.** *Mol Cell Biol*. 25(6):2475-2485.
- Kwon Y.T., Gupta A., Zhou Y., Nikolic M. and Tsai L.H. 2000. **Regulation of N-cadherin mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase.** *Curr Biol*. 10:363-372.
- Lee A., Kessler J.D., Read T. A., Kaiser C., Corbeil D., Huttner W. B., Johnson J. E. and Wechsler-Reya R.J. 2005. **Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum.** *Nature Neurosci*. 8:723-729.
- Leis O., Eguirara A., Lopez-Arribillaga E., Alberdi M.J., Hernandez-García S., Elorriaga K., Pandiella A., Rezola R. and Martin A.G. 2012. **Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells.** *Oncogene*. 31:1354-1365.
- Li M, Beard P and Estes PA. 1998. **Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly.** *J. Virol*. 72:2160-2167.

- López-Saavedra A. y Lizano-Soberón M. 2006. **Cáncer Cervicouterino y el virus de papiloma humano: la historia que no termina.** *Cancerología.* 1:31-55.
- Martin de Civetta M. T. y Civetta J. D. 2011. **Carcinogénesis.** *Salud Pública de México.* 53(5) 405-414.
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M. and Yamanaka S. 2003. **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** *Cell.* 113(5): 631–642.
- Mohan A., Kandalam M., Ramkumar H.L., Gopal L. and Krishnakumar S. 2006. **Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma.** *Br J Ophthalmol.* 90:889-893.
- Muñoz N., Bosc F.X., Castellsague X., Díaz M., De San Jose S., Hammouda D., Shah K. U. and Meijer C.J. 2004. **Again Wich human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective,** *International Journal of Cancer.* 111(2):296-327.
- Neumann J., Bahr F., Horst D., Kriegl L., Engel J., Luque R.M., Gerhard M., Kirchner T. and Jung A. 2011. **SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer.** *BMC Cancer.* 11-518.
- O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S. and Dick J. E. 2007. **A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.** *Nature.* 445:106-110.
- Oak P.S., Kopp F., Thakur C., Ellwart J.W., Rapp U.R., Ullrich A., Wagner E., Knyazev P. and Roidl A. 2012. **Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells.** *International Journal of Cancer.* 131(12):1-12.
- Okita K. and Yamanaka S. 2006. **Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells.** *Stem Cell Res.* 1:103–111.
- Olempska M., Eisenach P. A., Ammerpohl O., Ungefroren H., Fandrich F. and Kalthoff H. 2006. **Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6:92-97.
- Oshima Y., Suzuki A., Kawashimo K., Ishikawa M., Ohkohchi N., Taniguchi H. 2007. **Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting.** *Gastroenterology.* 132: 720-732.
- Palmieri S.L., Peter W., Hess H., and Scholer H.R. 1994. **Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation.** *Dev Biol.* 166:259-267.
- Pan G. and Thomson J.A. 2007. **Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency.** *Cell Research.* 17(1): 42-49
- Pan G., Li J., Zhou Y., Zheng H. and Pei D. 2006. **A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal.** *FASEB J.* 20(10):1730-1732.
- Pan G.J. and Pei D. Q. 2003. **Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor nanog.** *Cell Res.* 13:499-502.
- Patrawala L., Calhoun T. and Schneider-Broussard R. 2005. **Side Population Is Enriched in Tumorigenic, Stem-Like Cancer Cells, whereas ABCG2+ and ABCG2 Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic.** *Cancer Res.* 65(14):6207-6219.

- Peng S., Maihle, N.J., and Huang Y. 2010. **Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer.** *Oncogene*. 29:2153–2159.
- Perry M.E. and Levine A.J. 1993. **Tumor-suppressor p53 and the cell cycle.** *Curr Opin Genet Dev*. 3(1):50-54.
- Pesce M. and Scholer H.R. 2001. **Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development.** *Stem Cells*. 19:271-278.
- Polakis P. 1999. **The oncogenic activation of beta-catenin.** *Curr Opin Genet Dev*. 9:15–21.
- Polakis P. 2000. **Wnt signaling and cancer.** *Genes Dev*. 14(15):1837-1851.
- Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratessi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M.A. and Daidone M.G. 2005. **Isolation and vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with Stem/Progenitor Cell Properties.** *Cancer Res*. 65:5506-5511.
- Prosper F. and Verfaillie C. 2003. **Células madre adultas.** *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 26(3):345-356.
- Raaijmakers M.H., de Grouw E.P., Heuver L.H., van der Reijden B.A., Jansen J.H., Scheper R.J., Scheffer G.L., de Witte T.J, and Raymakers R.A. 2005. **Breast cancer resistance protein in drug resistance of primitive CD34+38- cells in acute myeloid leukemia.** *Clin Cancer Res*. 11:2436-2444.
- Reim G. and Brand M. 2002. **Spiel-ohne-grenzen/pou2 mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neuronal development.** *Development*. 129(4):917-933.
- Remenyi A., Schöler H.R. and Wilmanns M. 2004. **Combinatorial control of gene expression.** *Nat Struct Mol Biol*. 11:812–815.
- Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. 2007. **Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.** *Nature*. 445:111–115.
- Ryan A. K. and Rosenfeld M. G. 1997. **POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes.** *Genes Dev*. 11(10):1207-1225.
- Ryan C., Duane D., Mark W., Bruce S. and Deryl T. 2006. **Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells.** *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4(8) 1-13.
- Samowitz W.S., Powers M.D., Spirio L.N., Nollet F., van Roy F. and Slattery M.L. 1999. **Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas.** *Cancer Res*. 59:1442–1444.
- Santiago López L. M. 2012. **Evaluación de la expresión de las proteínas CK17, p63 y anexina II en líneas celulares, cultivos enriquecidos de CSC y muestras de pacientes de CaCU, por citometría de flujo.** *Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Zaragoza*. 47pp.
- Seigel G.M., Campbell L.M., Narayan M. and Gonzalez-Fernandez F. 2005. **Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma.** *Mol Vis*. 11:729-737.

- Sherman L., Jackman A. and Itzhaki H. 1997. **Inhibition of serum-and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation.** *Virology*. 237: 296–306.
- Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R. and Ben-Ze'ev A. 1999. **The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:5522–5527.
- Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1998. **Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer.** *Cancer Res.* 58:1130–1134.
- Strizzi L., Abbott D. E., Salomon D. S. and Hendrix, M. J. 2008. **Potential for cripto-1 in defining stem cell-like characteristics in human malignant melanoma.** *Cell Cycle*. 13(7):1931-1935.
- Sudhakar A. 2009. **History of Cancer, Ancient and Modern Treatment, Methods.** *Journal of Cancer Science & Therapy*. 1(2): 1– 4.
- Suo G., Han J. and Wang X. 2005. **Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers.** *Biochem Biophys Res Commun*. 337: 1047-1051.
- Sutton J., Costa R. and Klug M. 1996. **Genesis, a winged helix transcriptional repressor with expression restricted to embryonic stem cells.** *J Biol Chem*. 271:23126-23123.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., and Yamanaka S. 2007. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell*. 131: 861–872.
- Takeda J., Seino S. and Bell G.I. 1992. **Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues.** *Nucleic Acids Res.* 20:4613-4620.
- Ten Berge D., Kurek D., Blauwkamp T., Koole W., Maas A., Eroglu E., Siu R. K. and Nusse R. 2011. **Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells.** *Nat Cell Biol*. 13:1070–1075.
- Uchida N., Buck D. W., He D., Reitsma M. J., Masek M., Phan T. V., Tsukamoto A. S., Gage F. H. and Weissman I.L. 2000. **Direct isolation of human central nervous system stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:14720–14725.
- Van-Vlerken L. E., Hurt E. M. and Hollingsworth R. E. 2012. **The role of epigenetic regulation in stem cell and cancer biology.** *J Mol Med Berl*. 90:791–801.
- Visvader J.E. and Lindeman G. 2008. **Cancer stem cell in solid tumours; accumulating evidence and unresolved question.** *Nature Review Cancer*. 8:755-768.
- Vogelstein B., Lane D. and Levine A.J. 2000. **Surfing the p53 network.** *Nature*. 408:307-310.
- Wagner R. T., Xu X., Yi F., Merrill B. J. and Cooney A. J. 2010. **Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression.** *Stem Cells*. 28:1794–1804.
- Wang J., Guo L.P., Chen L.Z., Zeng Y.X. and Lu S.H. 2007. **Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line.** *Cancer Res*. 67:3716-3724.

- Warburg Otto H. 1930. **The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm.** *Institute for Biology Berlin-Dahlem.* 19(73):168.
- Weissman I.L. 2000. **Stem cells: units of development, unit of regeneration, and units in evolution.** *Cell.* 100:157-168.
- Willert K and Nusse R. 1998. **Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling.** *Curr Opin Genet Dev.* 8:95-102
- Wilson VG, West M and Woytek K. 2002. **Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features.** *Virus Genes.* 24:275-90.
- Wodarz A and Nusse R. 1998. **Mechanisms of Wnt signaling in development.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 114:59-88.
- Xiao-Fang L., Wen-Ting Y., Rui X., Jun-Tian L. and Peng-Sheng Z. 2014. **Cervical Cancer Cells with Positive Sox2 Expression Exhibit the Properties of Cancer Stem Cells.** *PLoS ONE.* 9(1):1-12.
- Xia W. and Jianwu Dai. 2010. **Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology.** *Stem Cells.* 28(5):885-893.
- YA-MIN C., CHENG-YANG C., YI-CHIANG H., MING-JENN C. and LIH-YUH C. W. 2012. **The role of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncoproteins in cervical epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis.** *Oncology Letters.* 3:667-671.
- Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J. and Holash J. 2000 **Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.** *Nature.* 407(6801):242-248.
- Yang L., Pang Y. and Moses H.L. 2010. **TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression.** *Trends Immunol.* 31:220–227.
- Yi F., Pereira L. and Merrill B. J. 2009. **Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal.** *Stem Cells.* 26(8):1951–1960.
- Yuan H., N. Corbi, C. Basilico and L. Dailey. 1995. **Developmentalspecific activity of the FGF4 enhancer requires the synergistic action of Sox-2 and Oct-3.** *Genes Dev.* 9:2635-2645.
- Zacarías F. M. 2006. **Virus del papiloma humano (VPH) y su potencial de prevención a través de una vacuna.** *Asociación mexicana de bioquímica clínica.* 3(31): 83-84.
- Zhong X., Li N., Liang S., Huang Q., Coukos G., and Zhang L. 2010. **Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells.** *J Biol Chem.* 285:41961–41971.
- Zhou H., Wu S. and Joo J. Y. 2009. **Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.** *Cell Stem Cell.* 4:381–384.
- Zhu Z. and Witte L. 1999. **Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor.** *Invest New Drugs.* 17:195-212.