



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MÉDICINA

**ANÁLISIS DE LA VÍA DE NF- $\kappa$ B EN CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER DE OVARIO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**M. EN C. CAROLINA GONZÁLEZ TORRES**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS**  
INSTITUTO NACIONAL DE MÉDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR

**DR. IVÁN VELASCO VELAZQUEZ**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Cáncer.....	3
3.2 Cáncer de ovario.....	7
3.3 Células troncales tumorales (CTTs).....	10
3.4 Identificación y características de las células troncales tumorales.....	13
3.5 Identificación de células troncales tumorales de ovario.....	16
3.6 Vías de señalización y células troncales tumorales.....	20
3.7 La vía de señalización del Factor Nuclear kappa B (NF-kB) y su participación en cáncer.....	20
3.8 NF-kB y células troncales tumorales.....	27
3.9 Cinasa I-kB alfa (IKK $\alpha$ ).....	29
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
V. JUSTIFICACIÓN.....	33
VI. HIPÓTESIS.....	33
VII. OBJETIVO GENERAL.....	34
7.1 Objetivos particulares.....	34
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
8.1 Línea celular y condiciones de cultivo.....	35

8.2	Análisis de citometría de flujo.....	35
8.3	Aislamiento de ARN y Transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	36
8.4	PCR semicuantitativo y cuantitativo .....	37
8.5	Ensayo de clonogenicidad por agar suave.....	37
8.6	Ensayo de formación de colonias .....	38
8.7	Ensayo de formación de ooesferas .....	38
8.8	Ensayo de tumorigenicidad <i>in vivo</i> .....	39
8.9	Inmunofluorescencia de células troncales de cáncer de ovario .....	39
8.10	Análisis de expresión por fluorescencia de micrografías .....	40
8.11	Análisis de proteínas por Western blot.....	40
8.12	Modulación de la vía de NF-kB .....	41
8.13	Análisis de actividad de la vía NF-kB mediante el ensayo del gen reportero .....	42
8.14	Ensayo de tumorigenicidad en pez cebra .....	42
8.15	Construcción y transfección de short hairpin (shRNA).....	43
8.16	Análisis estadístico .....	44
IX.	RESULTADOS .....	45
9.1	Aislamiento de CTTs de ovario .....	45
9.1.1	Aislamiento de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3.....	45
9.2	Caracterización de CTTs de ovario .....	47
9.2.1	Capacidad de clonogenicidad y formación de ooesferas de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3.....	47

9.2.2 Evaluación de tumorigenicidad de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3 en ratones desnudos .....	49
9.3 Participación de NF-kB en CTTs de ovario .....	50
9.3.1 Expresión de subunidades de NF-kB en CTTs de la línea celular SKOV3 .....	50
9.3.2 Participación de la vía de canónica de NF-kB, en el fenotipo de CTTs de la línea celular SKOV3 .....	55
9.3.3 Participación de IKK $\alpha$ , en el fenotipo de CTTs de la línea celular SKOV3 .....	61
X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	63
XI.REFERENCIAS .....	70
XII. ANEXOS .....	80
12.1 Tabla 1 .....	80
12.2 Figura suplementaria 1 .....	81
12.3 Figura suplementaria 2 .....	82
XIII. ARTÍCULO .....	83

## I. RESUMEN

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), es uno de los principales factores de transcripción que ha sido relacionado con las células troncales de diversos tumores. Es poco lo que se conoce acerca de la asociación entre las células troncales tumorales y los reguladores cascada río arriba de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B y las células troncales tumorales de ovario, por lo que el principal objetivo de este estudio fue el detallar la importancia del efecto que tiene las vías de señalización de NF- $\kappa$ B canónica y no canónica en las características de las células troncales de líneas celulares de cáncer de ovario. Para ello se aislaron células troncales tumorales a partir de la línea celular SKOV3 de ovario mediante el marcador CD44. En estas células se cuantificaron los niveles de proteína y RNA mensajeros de genes asociados al fenotipo de células troncales tumorales, así como de genes de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B. El fenotipo de las células troncales tumorales aisladas como subpoblación positiva a CD44 (CD44+) fue principalmente determinado a través de ensayos de clonogenicidad, formación de colonias, crecimiento independiente de anclaje, además de ensayos de formación de tumores *in vivo*. Se determinó que la subpoblación CD44+ presento altos niveles expresión de los genes relacionados con el fenotipo troncal tumoral, así como capacidad de formación de tumores. Además, se encontró que estas células presentaron alta expresión de RelA y RelB principales moléculas efectoras de la vía de señalización NF- $\kappa$ B, así como IKK $\alpha$ , una de las principales cinasas inductoras de ambas vías de activación canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B. Por lo que se realizaron ensayos de pérdida de función empleando shRNAs y una construcción que expresa una proteína con función de dominante negativo. El efecto de la inhibición de la vía canónica a través de la proteína dominante negativa de I $\kappa$ B $\alpha$ , fue una disminución en el número de células de la población CD44+, además del impacto en su fenotipo troncal y en su capacidad de formación de tumores. De acuerdo con estos resultados al inhibir la cinasa IKK $\alpha$  se observó una baja expresión de genes involucrados en el fenotipo de las células troncales tumorales de ovario CD44+. Esto es uno de los primeros trabajos que reporta la participación de varias moléculas que pertenecen a las vías de activación de NF- $\kappa$ B en el mantenimiento del fenotipo de las células troncales tumorales de ovario.

## II. ABSTRACT

Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is one of the main transcription factors that has been related to the stem cells of various tumors. Little is known about the association between tumor stem cells and cascade regulators upstream of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and ovarian tumor stem cells, so the main objective of this study was to detail the importance of the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways in stem cells of ovarian cancer cell lines. To this, the tumor stem cells of the SKOV3 ovarian cell line were isolated by the marker CD44, in these cells the levels of protein and messenger RNA of genes associated to the tumor stem cell phenotype were quantified, as well as of the genes of the NF- $\kappa$ B pathway. The phenotype of tumor stem cells isolated as positive subpopulation to CD44 (CD44+) was mainly determined through clonogenicity, colony formation and anchorage independent growth assays, in addition to tumor formation assays *in vivo*. It was determined that the CD44+ subpopulation presented high expression levels of genes related to the tumor stem phenotype, as well as the capacity of tumor formation. It was found that these cells also showed high expression of RelA and RelB, main molecules of NF- $\kappa$ B signaling pathway, as well as IKK $\alpha$ , one of the main kinases that induces the activity of canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways. Therefore, the loss of function assay was made using shRNAs and a construction that expresses a protein with a dominant negative function. The effect of the inhibition of the canonical pathway through the negative dominant protein of I $\kappa$ B $\alpha$ , was a decrease in the number of cells of the CD44+ population, in addition to the impact on its core phenotype and on its capacity for tumor formation. According to these results, inhibiting the IKK $\alpha$  kinase showed low expression of genes involved in the phenotype of CD44+ ovarian tumor stem cells. This is one of the first studies that reports the participation of several molecules that belong to the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathways in the maintenance of the phenotype of the ovarian tumor stem cells.

### **III. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades con diversos factores de riesgo y epidemiología, por lo que representa un gran problema de salud a nivel mundial. Existen más de 100 tipos distintos de cáncer reportados y subtipos de tumores encontrados dentro de órganos específicos del cuerpo humano (Hanahan & Weinberg, 2000; Stratton, Campbell, & Futreal, 2009), y en todos ellos, el genoma está invariablemente alterado en múltiples sitios, lo que les proporciona una capacidad de proliferación descontrolada, así como un aumento en su capacidad de invadir y establecerse en nuevos tejidos u órganos distantes (Stratton et al., 2009). De tal manera que las células de cáncer se caracterizan principalmente por tener defectos en la regulación de la proliferación celular normal y la homeostasis celular (Hanahan & Weinberg, 2000).

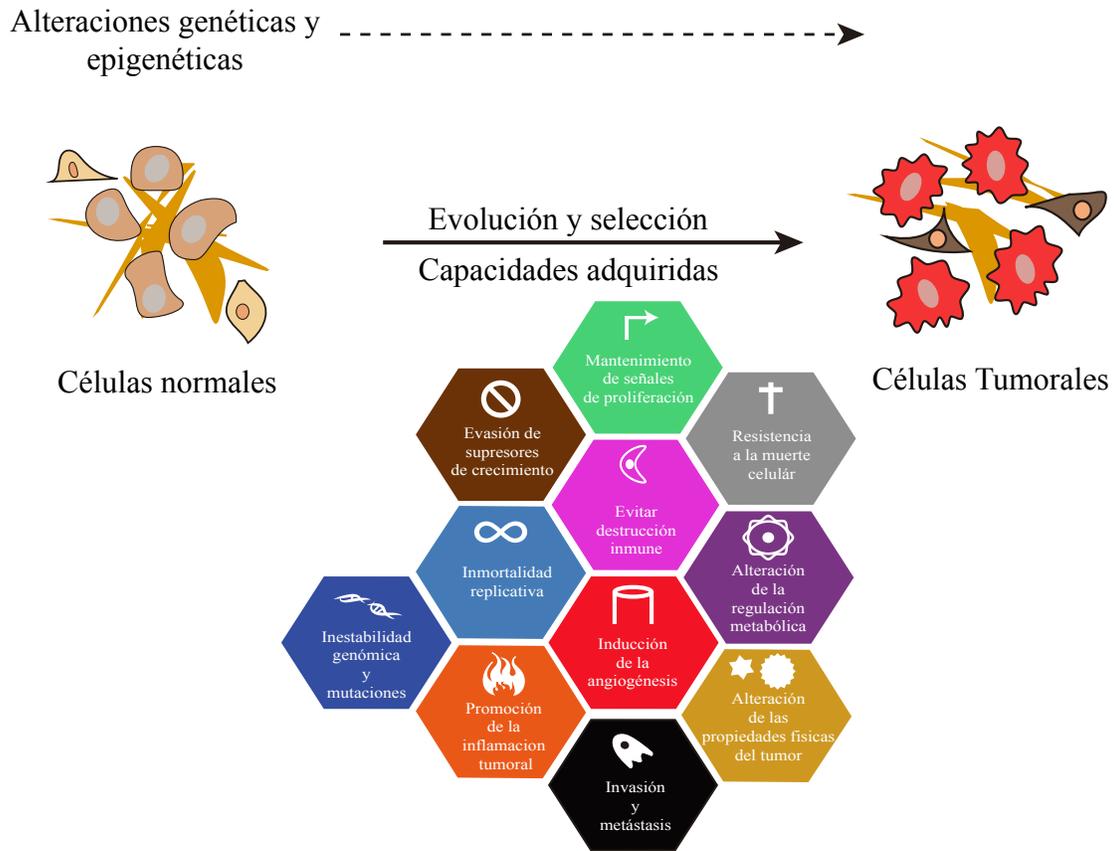
Derivado de una gran cantidad de información revelada por varias investigaciones se sugiere entonces que un número de rasgos moleculares, bioquímicos y celulares, conducen a la adquisición de capacidades distintivas por parte de las células tumorales. Las características principales de las células tumorales incluyen la autosuficiencia para generar señales proliferativas sostenidas, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, evasión de la muerte celular programada, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis a otros tejidos, la evasión de la destrucción inmunológica y reprogramación del metabolismo energético que en conjunto con inestabilidad del genoma e inflamación son compartidas en mayor o menor medida por muchos si no quizás todos los tipos de cáncer humanos (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). En el caso de las dos primeras características descritas, autosuficiencia para generar

señales proliferativas sostenidas e insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, no son del todo aisladas y podrían superponerse, promoviendo la función conjunta de genes supresores y promotores del cáncer, lo que puede generar una ventaja proliferativa y por consecuencia la selección de una población específica de células. El potencial replicativo ilimitado es una característica esencial de la progresión tumoral causado por un incremento en la actividad de la telomerasa (Shay & Wright, 2011), la cual permite el alargamiento de los telómeros protegiendo a los cromosomas de su degradación, que en conjunto con la evasión de la muerte celular programada o apoptosis, proceso que normalmente resulta por defectos en la actividad de proteínas anti-apoptóticas o pro-apoptóticas, potencia la sobrevivencia de las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011). La gran presión que ejercen los tumores por el aumento de las células cancerosas conlleva a la reducción del flujo sanguíneo e hipoxia, la cual activa el proceso de angiogénesis, estimulando la generación de nuevos vasos sanguíneos lo que en consecuencia suplirá al tumor de oxígeno y nutrientes y genera una ruta de evacuación de desechos metabólicos y dióxido de carbono. Al respecto de este fenómeno de hipoxia, la falta de nutrientes y acumulación de residuos metabólicos en el tumor y la capacidad de reprogramación del metabolismo energético por la célula tumoral toma una gran importancia. Como respuesta a estas condiciones, las células cambian de la fosforilación oxidativa a la glucólisis denominada aeróbica, e incrementan el consumo de glucosa gracias a la sobreexpresión de transportadores de glucosa como Glut-1 (Hanahan & Weinberg, 2011).

La diseminación del cáncer es posible sólo a través de una secuencia de pasos discretos o lo que se ha llamado por algunos autores, cascada de invasión-metástasis. El noventa por ciento de las muertes por cáncer se han asociado a la diseminación a otros órganos (Chaffer & Weinberg, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011). Este proceso comienza con la

invasión del tejido circundante, seguido de intravasación de células cancerosas al torrente sanguíneo y vasos linfáticos. Una vez alcanzado el órgano distante las células cancerosas escapan de los vasos sanguíneos e invaden los tejidos donde podrán sobrevivir y proliferar (Chaffer & Weinberg, 2011). El hecho de que las células tumorales puedan escapar a la detección y evadan la respuesta inmunológica, toma gran importancia como ventaja selectiva.

La inestabilidad del genoma incrementa la tasa de mutaciones y particularmente se considera como una de las características más destacadas que desencadena la heterogeneidad celular en los tumores (Hanahan & Weinberg, 2011; Horne, Pollick, & Heng, 2015). El sistema inmune por su parte, juega un papel importante en el control del desarrollo y progresión del cáncer, en especial la inflamación permite la progresión tumoral por diversas vías. Las células inmunes secretan una gran cantidad de señales moleculares, enzimas, además de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el microambiente tumoral. Estas señales moleculares pueden activar señales de proliferación, resistencia a muerte celular, además de contribuir con la inestabilidad genómica, estimular la angiogénesis y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011). De tal manera que la tumorigénesis o el desarrollo y progresión de cáncer se considera un proceso de pasos múltiples dependientes entre sí y cada uno de ellos involucra alteraciones genéticas a nivel de la secuencia de ADN y/o cambios epigenéticos con alteración de estructura de cromatina y expresión de genes consecuencia de metilación de residuos de citosina, los cuales se asocian a la adquisición de las capacidades antes mencionadas (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Stratton et al., 2009), y favorecen la transformación progresiva de células humanas normales en células altamente malignas (Figura 1).



**Figura 1. Transformación tumoral.** El proceso de transformación de una célula normal a célula tumoral además de involucrar alteraciones genéticas y epigenéticas, involucra la adquisición de características distintivas a lo largo del desarrollo tumoral. Tomada y modificada de Fouad y Aanei, 2017 (Fouad & Aanei, 2017).

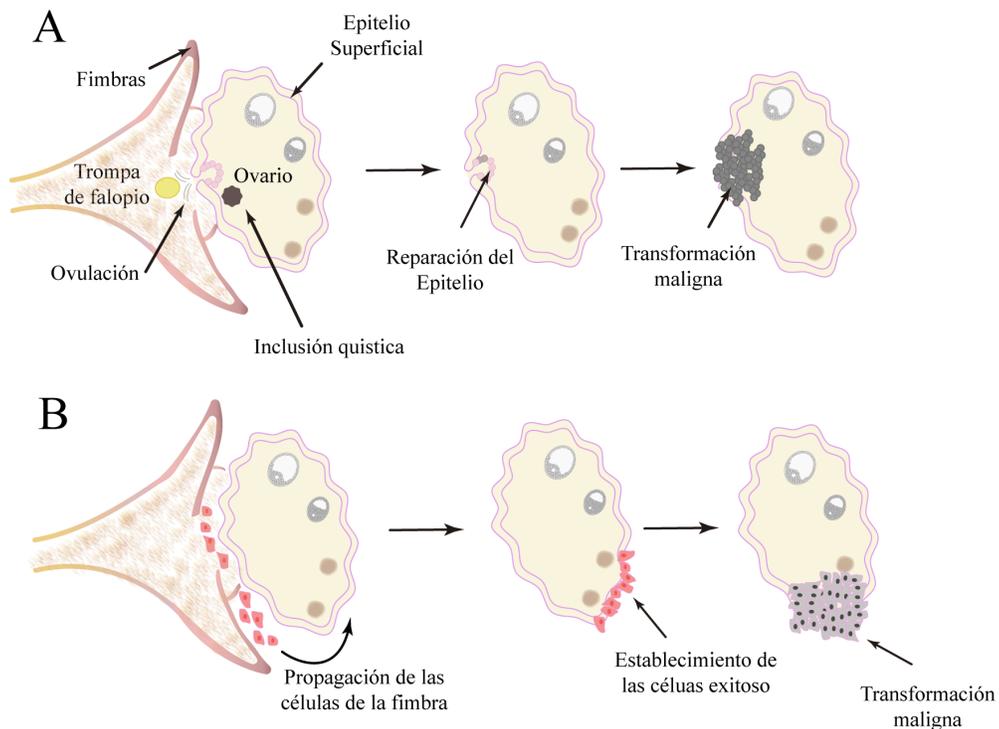
### **3.2 Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario ocupa a nivel mundial el séptimo lugar dentro de los tipos de cáncer más comunes y el octavo lugar como causa de muerte entre mujeres, actualmente es considerado una de las malignidades ginecológicas más letales, con aproximadamente 240,000 casos diagnosticados anualmente (Ferlay et al., 2015). Este grupo de tumores se caracterizan por una rápida progresión a metástasis lo que restringe las opciones de tratamiento efectivo (Bast, Hennessy, & Mills, 2009; Lengyel, 2010; Weiderpass & Labreche, 2012). La metástasis puede ocurrir a través de los nodos linfáticos al hilio renal o a través de los vasos sanguíneos al parénquima del hígado o pulmón. Sin embargo, es más frecuente que pequeños grupos de células se desprendan del ovario y se implanten en la superficie peritoneal, formando numerosos nódulos (Bast et al., 2009). Aproximadamente 75% de las pacientes con esta enfermedad son diagnosticadas en etapas avanzadas lo cual se atribuye a manifestaciones clínicas no específicas y métodos de detección ineficaces (Kujawa & Lisowska, 2015). Debido a su mal pronóstico y a la dificultad para indicar tratamientos estándar para cáncer de ovario en etapa avanzada, la resección quirúrgica seguida de quimioterapia con platinos-taxanos sigue siendo el método de tratamiento común y aceptado (Y. Liu et al., 2017). Se ha reportado que alrededor del 70% de las pacientes presentan reincidencia de la enfermedad en menos de 5 años después del tratamiento y mueren debido al desarrollo de quimioresistencia (Agarwal & Kaye, 2003; Bast et al., 2009; Conic, Dimov, Tasic-Dimov, Djordjevic, & Stefanovic, 2011; Pignata et al., 2011; Poveda Velasco et al., 2007; Stehman, Brady, Thigpen, Rossi, & Burger, 2012).

A nivel histológico, el cáncer de ovario es extremadamente heterogéneo, ya que es un órgano complejo en el cual se distinguen varios componentes celulares. El cáncer de ovario puede desarrollarse tanto en células germinales como células de la granulosa o teca. Sin

embargo, el subtipo histológico más prevalente en el cáncer de ovario es el de origen epitelial (EOC, del inglés *epithelial ovarian cancer*) que representa más del 90% de los tumores primarios de ovario y se presenta generalmente en mujeres mayores de 40 años con un incremento en la incidencia en mujeres entre los 60 y 79 años de edad (Siegel, Miller, & Jemal, 2016; Webb & Jordan, 2017). El EOC puede tener su origen en el epitelio superficial del ovario o bien de inclusiones quísticas del epitelio superficial (Figura 2A). De manera interesante, su origen ha sido asociado con el proceso de ovulación, ya que se ha propuesto que las células troncales somáticas que contribuyen a la reparación y regeneración del epitelio celómico después de la liberación del ovocito están expuestas constantemente a un ambiente inflamatorio. Más aún, estas células llevan a cabo repetidas divisiones asimétricas derivando en células troncales somáticas y en células progenitoras para tratar de reparar el tejido en repetidos ciclos. Ambos procesos, inflamación y múltiples ciclos de división celular a lo largo del tiempo, podrían generar quistes de inclusión los cuales al estar constantemente expuestos a factores de crecimiento eventualmente se transforman dando lugar al EOC (Bast et al., 2009; Bukovsky, Caudle, Svetlikova, & Upadhyaya, 2004; Cho & Shih Ie, 2009; Szotek et al., 2006). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el EOC no siempre presenta las características del epitelio mesodérmico, lo que ha dado lugar a una segunda hipótesis en donde el EOC se podría originar en las trompas de Falopio, específicamente en las células epiteliales de las fimbrias que al ser expuestas a las moléculas proinflamatorias durante la ovulación, forman lesiones premalignas. Estas células transformadas pueden ser expulsadas de las fimbrias y propagarse en la superficie del ovario, establecerse y dar origen a la formación del tumor (Erickson, Conner, & Landen, 2013; Klotz & Wimberger, 2017; Levanon, Crum, & Drapkin, 2008; Li, Fadare, Xiang, Kong, & Zheng, 2012) (Figura 2B).

A pesar de que las teorías anteriores son ampliamente aceptadas, recientemente se ha propuesto que el cáncer de ovario se origina posiblemente por la presencia de una población celular conocida como “células troncales tumorales”. Se ha reportado también que esta población puede ser la responsable de la reincidencia de la enfermedad después de que las pacientes han sido tratadas debido a que tienen la capacidad de evadir la quimioterapia, además de su habilidad para autorrenovarse, evadir la apoptosis y sobrevivir en microambientes no favorables (Ahmed, Abubaker, Findlay, & Quinn, 2013; Foster, Buckanovich, & Rueda, 2013; Seguin, Gozo, Weis, & Cheresch, 2014; Telleria, 2013; W. Zhang et al., 2013). Es importante aclarar que esta teoría no se contrapone con las anteriores, posiblemente las células que están involucradas en los eventos antes mencionados podrían corresponder a la población de células troncales tumorales.



**Figura 2. Origen del cáncer de ovario epitelial.** A) El epitelio superficial del ovario sufre rupturas cíclicas inducidas por la ovulación, las células del epitelio al estar expuestas a estímulos inflamatorios y daño en ADN, las puede conducir a la formación de inclusiones quísticas, las cuales se dan por la invaginación cortical del epitelio superficial y pérdida de comunicación con la superficie también pueden derivar en una transformación de células cancerosas. B) Las células del epitelio que recubre la trompa de Falopio pueden adquirir características tumorales, ser expulsadas por las fimbrias, propagarse hasta la superficie del ovario donde pueden establecerse en el epitelio superficial y continuar su transformación tumoral.

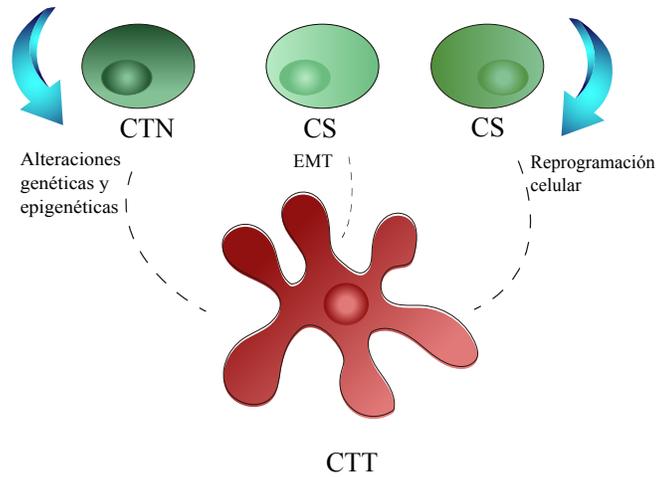
### **3.3 Células troncales tumorales (CTTs)**

El cáncer está constituido por una población de células heterogéneas, diferentes en morfología, expresión de genes, capacidad proliferativa e invasividad. Esta heterogeneidad puede ocurrir como resultado de una organización celular jerárquica dentro del cáncer. Se ha descrito que el tumor alberga una subpoblación especial de células cancerosas denominadas células troncales tumorales (CTTs) con características fenotípicas y genéticas muy particulares, similares a las células troncales normales (Pardal, Clarke, & Morrison, 2003). Las CTTs fueron identificadas en 1997 por Bonnet y Dick en leucemia (Bonnet & Dick, 1997), y posteriormente se demostró que existen en muchos tipos de tumores sólidos, incluyendo cáncer de colon (Schepers et al., 2012), cerebro (S. K. Singh et al., 2004), mama (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003), ovario (Bapat, Mali, Koppikar, & Kurrey, 2005), pulmón (Eramo et al., 2008), melanoma (Y. Luo et al., 2012), entre otros.

Las células troncales tumorales se caracterizan por representar una pequeña población, además se ha demostrado que el porcentaje de estas células varía de acuerdo a cada tumor. Las propiedades principales de estas células son la capacidad ilimitada de autorrenovación, capacidad de diferenciación multilínea, potencial de clonación para la iniciación del tumor,

y para su repoblación a largo plazo (Kim et al., 2017); por lo que el término “células troncales tumorales”, se refiere a una definición funcional y han sido recientemente descritas como: una subclase de célula troncal que propaga clonas malignas indefinidamente y produce cáncer (Quan et al., 2018).

El origen de las CTTs aún no se ha precisado completamente, de hecho existen tres hipótesis principales para explicar la adquisición de sus propiedades: 1) la transformación maligna de una célula troncal normal, posiblemente a través de la acumulación de diferentes alteraciones epigenéticas y genéticas durante un largo periodo de tiempo, dado que las mutaciones son eventos de baja frecuencia (Fillmore & Kuperwasser, 2008; Smalley & Ashworth, 2003); 2) la desdiferenciación de una célula de cáncer madura mediante el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*), se ha demostrado que las CTTs pueden ser enriquecidas dentro del tumor por desdiferenciación de células tumorales maduras a través de la vía de TEM. La vía de TEM concede a las células tumorales la habilidad de autorrenovarse y permite la formación de sitios distantes de metástasis (Mani et al., 2008; Qiao, Chen, Hu, Tao, & Lam, 2013; Qiao et al., 2012) y 3) la formación de células de cáncer pluripotentes, a partir de la reprogramación de células somáticas adultas, mediante la inducción de cuatro factores de transcripción OCT3/4 (POU5F1), Sox2, c-Myc y Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Es importante aclarar que todos estos modelos no son mutuamente excluyentes (Figura 3).

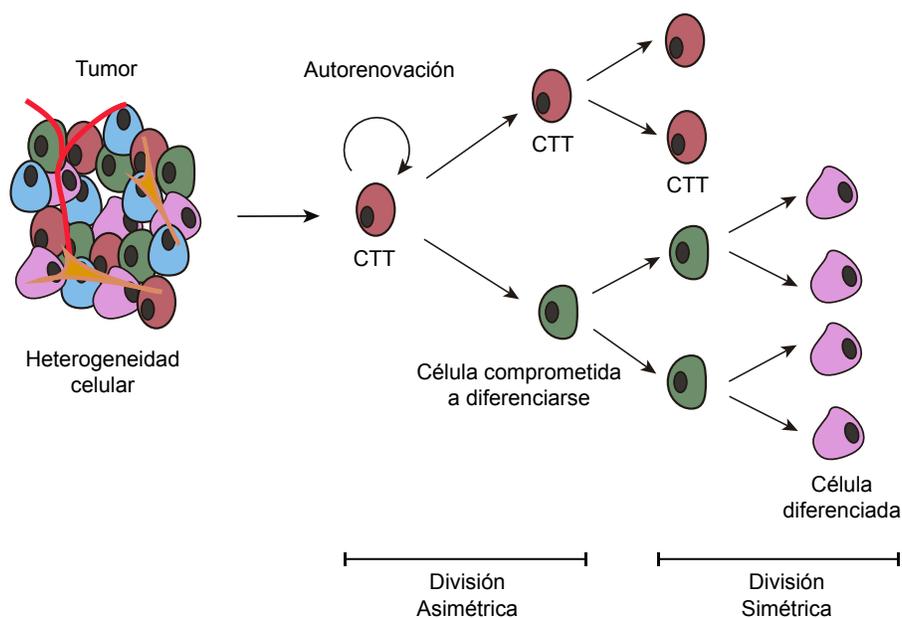


**Figura 3. Origen de las células troncales tumorales (CTTs).** Representación esquemática de tres posibles hipótesis del origen de las CTTs a partir de una célula troncal normal (CTN) que sufre alteraciones genéticas y epigenéticas, o bien a partir de una célula somática (CS) que mediante transición epitelio mesénquima adquiere características troncales tumorales o bien de una reprogramación de la expresión de genes. Tomada y modificada de Welte et al., 2010 (Welte, Adjaye, Lehrach, & Regenbrecht, 2010).

Las principales estrategias mediante las cuales se han podido identificar a las células troncales tumorales incluyen la detección de diversos epítopes de membrana y el uso de nanopartículas, posteriormente estas células han sido propagadas en condiciones de crecimiento específicos, lo cual es seguido de la confirmación de su fenotipo troncal, mediante la caracterización funcional de su potencial clonogénico, ensayos de formación de estructuras independientes de anclaje (esferoides) y potencial tumorigénico usualmente en trasplantes en animales inmunodeficientes (Aceto et al., 2014; Dashzeveg et al., 2017; Shaw et al., 2012).

### 3.4 Identificación y características de las células troncales tumorales

Como parte de sus características fundamentales y distintivas, las células troncales tumorales pueden presentar plasticidad, es decir, tienen la capacidad de dividirse de manera asimétrica y generar una célula troncal tumoral idéntica y una célula que estará comprometida a diferenciarse y amplificarse por división simétrica (Yoo & Kwon, 2015). A través de este mecanismo, las células troncales tumorales son capaces de autorrenovarse y originar una progenie con características fenotípicas diversas, lo que contribuye al desarrollo del tumor (Figura 4). En el trabajo de Pine y colaboradores, empleando el análisis de tiempo real de una sola célula para trazar herencia de genes durante la división celular de poblaciones CTTs positivas a CD133 las cuales fueron aisladas de líneas celulares de cáncer de pulmón y células de tumores primarios, se determinó que el ADN genómico fue heredado de forma desigual a las células hijas. Más aún, las células que heredaron mayor ADN proveniente de las células maternas CTTs, mantuvieron las características de CTTs, mientras que aquellas que heredaron una menor cantidad de ADN adoptaron un fenotipo más diferenciado (Pine, Ryan, Varticovski, Robles, & Harris, 2010).



**Figura 4. Esquema general de la presencia de CTTs en el tumor y su capacidad de división celular.** La división asimétrica, permite el origen de una nueva CTT que conserva todas las características parentales y da origen a una célula comprometida a diferenciación, que posteriormente por divisiones simétricas pueden expandir sus poblaciones.

A pesar de que las CTTs, poseen proteínas específicas de superficie celular, éstas se expresan de forma heterogénea entre los diferentes tumores, por lo que no existe un único marcador de superficie para poder identificar la población de CTTs en todos los tipos de cáncer. Debido a esto es necesario emplear más de un marcador de superficie para poder aislar este tipo de células. En la mayoría de los tumores sólidos se ha reportado que las proteínas de superficie celular CD44, CD24, CD133, ESA, CD90, CD45, CD117, EpCAM y el transportador ABCB5 (Schatton, Frank, & Frank, 2009) entre otros, son marcadores para aislar CTTs; sin embargo, múltiples investigaciones indican que la expresión de estos marcadores puede variar dependiendo del tejido y pueden ser expresados de manera heterogénea en el tumor, por lo que es necesario emplear la combinación de dos o tres marcadores para poder aislar esta población celular más pura o enriquecida.

Otra de las características de las CTTs es que expresan factores de transcripción pluripotentes, descritos en células troncales normales, los cuales funcionan como represores de la diferenciación, y permiten mantener las propiedades de pluripotencia y autorenovación. Entre los más comunes encontramos a OCT4, Sox2 y Nanog. Estos factores de transcripción tienen un papel importante en la proliferación de CTTs, además de modular rutas de señalización para inhibir la apoptosis (Apostolou, Toloudi, Chatziioannou, Ioannou, & Papisotiriou, 2012; A. Liu, Yu, & Liu, 2013).

Como parte de sus características, las CTTs además de expresar en cantidades significativas los transportadores de drogas ABC, poseen una maquinaria activa de reparación de ADN y

presentan la habilidad de evasión de la apoptosis (Anest et al., 2003; Gupta et al., 2011; Yamamoto, Verma, Prajapati, Kwak, & Gaynor, 2003). En este sentido, se ha descrito que poblaciones de CTTs poseen altos niveles de proteínas inhibidoras de la apoptosis, (IAPs, del inglés *IAPs- Inhibitor of Apoptosis Proteins*), así como proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2, como se demostró en células de glioblastoma CD133 positivas (consideradas células troncales por la presencia de este marcador). Dichas células muestran niveles elevados de expresión de XIAP y cIAP1, así como BCL-2 y Bcl-X<sub>L</sub> comparadas con su contraparte la población CD133 negativas (G. Liu et al., 2006). Más aún, altos niveles de expresión de Bcl-2 también fueron identificados en células troncales de cáncer de mama con fenotipo CD44+/CD24 (-/low) (Madjd et al., 2009).

Las CTTs son células con capacidad de metástasis debido a su gran potencial migratorio e invasivo (Pietras et al., 2014). Recientemente se ha reportado que las CTTs interactúan con macrófagos para promover la invasión del tumor y escapar de la muerte por parte de las células NK (NK del inglés *Natural Killer Cells*) (B. Wang et al., 2014; Ye et al., 2012; Zhou et al., 2015).

Por otra parte, las CTTs muestran resistencia a quimioterapia y radioterapia convencionales (Clevers, 2011), posiblemente debido a que estas células permanecen usualmente en un estado quiescente del ciclo celular por largos periodos de tiempo, y posteriormente pueden reiniciar el ciclo celular. Por ejemplo, se ha demostrado que las CTTs derivadas de meduloblastoma después de ser sometidas a tratamientos de radioterapia entran en un estado de quiescencia por 6 horas y 76 horas después reinician el ciclo celular, ya sea a través de la activación de la señalización de Akt por pérdida de PTEN o bien por activar la vía de PI3K/Akt que induce arresto celular dependiente de p53 (Yamamoto et al., 2003).

Las CTTs residen en áreas muy específicas dentro de los tejidos tumorales denominadas nichos. Los nichos les permiten a las CTTs, preservar sus características como su estado indiferenciado, además las protegen del sistema inmune y participan en la regulación de su proliferación y diferenciación durante la tumorigénesis y progresión, a través de una combinación de varios tipos celulares como células del sistema inmune, fibroblastos asociados cancer, células mesenquimales entre otras, las cuales secretan diferentes factores presentes en el tumor (Plaks, Kong, & Werb, 2015; Varas-Godoy, Rice, & Illanes, 2017). Se ha reportado que los nichos también juegan un papel importante en la resistencia de las CTTs frente a tratamientos de quimioterapia y radioterapia, en este proceso la presencia y protección por parte de las células endoteliales y murales es fundamental (Cheng et al., 2013; Folkins et al., 2009; Ping & Bian, 2011; Ping et al., 2011; Ping, Zhang, & Bian, 2016; Ricci-Vitiani et al., 2010; Scully et al., 2012; R. Wang et al., 2010; Yao et al., 2008).

### **3.5 Identificación de células troncales tumorales de ovario**

Los investigadores Hamburger y Salmon en 1977, fueron los primeros en probar el aislamiento y crecimiento de células troncales tumorales de ovario, a partir de fluido ascítico derivado de pacientes con adenocarcinoma de ovario en estado avanzado, mediante el desarrollo del ensayo de clonogenicidad en agar suave, que permite el crecimiento celular en condiciones in vitro. Observaron y determinaron la eficiencia de formación de colonias, sugiriendo que las células troncales tumorales son las únicas con esta capacidad (Hamburger & Salmon, 1977). Estos hallazgos generaron la necesidad de caracterizar la subpoblación de CTT de ovario, así como de detectar estas células a través de otras estrategias como la presencia de marcadores de superficie celular (antígenos de superficie celular) y establecer sus mecanismos de autorrenovación a través del estudio de cinética de

formación de colonias (Buick & MacKillop, 1981). Bapat y colaboradores (Bapat et al., 2005), fueron los primeros en presentar evidencia de que la agresividad del cáncer de ovario puede atribuirse a las células troncales tumorales en este tejido a través de ensayos *in vivo*. Estos investigadores aislaron dos clonas tumorigénicas derivadas de una muestra de una paciente con cáncer de ovario avanzado que se organizaron en estructuras esféricas independientes de anclaje (esferoides) en cultivo. Estas clonas fueron capaces de establecer tumores en ratones inmunodeficientes con histopatología similar a los tumores de humanos parentales, e incluso demostraron la capacidad de autorrenovarse formando nuevos tumores después de ser trasplantadas en serie. En otro estudio con cáncer de ovario se determinó la existencia de las CTTs en muestras de adenocarcinomas derivados de pacientes. Se observó que al disgregar el tejido de los adenocarcinomas y colocarlos en cultivos independientes de anclaje solo algunas de las células disociadas formaron esferoides. Se determinó que las células derivadas de los esferoides presentaron expresión de marcadores de superficie como CD44. Al purificar la población CD44 de los esferoides, se estableció que sólo 100 células positivas a CD44 (CD44+), pudieron recapitular completamente el tumor original, mientras que 10<sup>5</sup> células negativas para CD44 (CD44-) no generaron crecimiento del tumor cuando fueron trasplantadas en ratones inmunodeficientes (S. Zhang et al., 2008). Del mismo modo, el grupo de Alvero y colaboradores (Alvero et al., 2009) mostraron que las células CD44+ provenientes de pacientes con cáncer de ovario aisladas y trasplantadas en ratones inmunodeficientes dan lugar a tumores, sugiriendo su capacidad de diferenciación y autorrenovación. Por otro lado, en condiciones *in vitro* las células CD44+ derivadas de pacientes con cáncer de ovario, fueron capaces de formar esferoides los cuales mantuvieron un alto porcentaje de células CD44+ (mayor a 90%), aún después de múltiples pases para la formación de nuevos esferoides (mayor a 20 pases). Este modelo de cultivo *in vitro*

independiente de anclaje para la formación de esferoides ha sido empleado para examinar la capacidad de quimioresistencia, transición epitelio mesénquima así como el papel de vías de señalización proinflamatorias en la autorrenovación de CTTs derivadas de varios tumores (Chefetz et al., 2013; Craveiro et al., 2013; Yin et al., 2013).

Por otra parte, también se ha determinado que las células CD44+ derivadas de cultivos celulares provenientes de muestras de pacientes con cáncer de ovario, muestran una gran capacidad de quimioresistencia a cisplatino y/o paclitaxel, mientras que la fracción CD44- es quimiosensible y responde al tratamiento. Asimismo, las células CD44+ presentan aumento en la expresión de marcadores de células troncales normales (Bmi-1, factor de células troncales (SCF), Notch-1, Nanog, Nestina, ABCG2, y Oct4) comparado con células de tumor parental (células CD44-) creciendo bajo condiciones similares (Mor, Yin, Chefetz, Yang, & Alvero, 2011; Yan, Zuo, & Wei, 2015; S. Zhang et al., 2008).

Con respecto a la proteína CD44, con la cual se han identificado en diversos trabajos las CTTs de ovario como previamente se ha descrito, es una glicoproteína transmembranal multifuncional que funciona como receptor de hialuronano ó ácido hialurónico. Es considerada un componente de la matriz extracelular, se ha involucrado en el crecimiento celular, diferenciación, movilidad y también ha sido identificada como un marcador de CTTs en una gran variedad de tumores (Morath, Hartmann, & Orian-Rousseau, 2016). Sin embargo, no es el único marcador para identificar a la población de CTTs de ovario, como sucede en otros tipos de tumores, algunas de las proteínas que también se han reportado para la identificación de CTTs de ovario incluyen a CD133, CD117, ALDH1A1 y EpCAM (Curley et al., 2009; Kryczek et al., 2012; Kusumbe, Mali, & Bapat, 2009; L. Luo et al., 2011; Silva et al., 2011; Stewart et al., 2011; Szotek et al., 2006; Wei et al., 2010).

En lo que respecta al porcentaje de CTTs de ovario, se ha observado mediante el uso de estos marcadores que el número de estas células es bajo, sin embargo un hecho destacable es que después de tratamientos de quimioterapia con platinos se ha observado que esta población incrementa significativamente. Asimismo aumenta el nivel de la aldehido deshidrogenasa isoforma 1 (ALDH1) reportada como marcador de CTTs de ovario, la cual es una enzima citosólica responsable de la oxidación de una gran variedad de aldehidos intracelulares a ácidos carboxílicos (Douville, Beaulieu, & Balicki, 2009; Kim et al., 2017). A su vez se observó también que disminuyen las células diferenciadas normales del tumor, todo lo anterior se correlaciona directamente con una resistencia al platino (Ayub et al., 2015; Bonneau et al., 2015; Kuroda et al., 2013; Pylvas-Eerola, Liakka, Puistola, Koivunen, & Karihtala, 2016; Steg et al., 2012). La resistencia de las CTTs a quimioterapia puede explicarse por varias rutas: 1) Inicialmente a pesar de que los platinos generan un daño en el ADN de células en proliferación durante la división celular, si existen células quiescentes el platino no daña el ADN de esta población, siendo la quiescencia una de las características de la población de CTTs, se espera estas no sufran daño. 2) Se ha demostrado que estas células pueden reprogramar factores de transcripción como PBX1, el cual media la resistencia a quimioterapia en carcinomas de ovario. Además se ha observado que altos niveles de expresión de PBX1 correlacionan con sobrevida corta en pacientes con cáncer de ovario después de ser tratados con quimioterapia. Particularmente mediante ensayos de coimmunoprecipitación se determinó que el factor de transcripción PBX1 se une a sitios promotores de genes involucrados en el mantenimiento del fenotipo de CTTs, por lo que el silenciamiento de PBX1 sensibiliza a las CTT ante el tratamiento con platinos (Jung et al., 2016). 3) Otra ruta que ha sido señalada como responsable de la resistencia a la quimioterapia involucra la presencia del receptor CD44 que al unirse a la hialuronano

(glicosaminoglicano presente en la matriz extracelular), puede inducir la activación de Nanog, conduciendo a la activación de procesos como la TEM y a la activación de genes como MDR1 a través de la activación de STAT3 lo que resulta en resistencia a la quimioterapia (Bourguignon, Peyrollier, Xia, & Gilad, 2008).

### **3.6 Vías de señalización y células troncales tumorales**

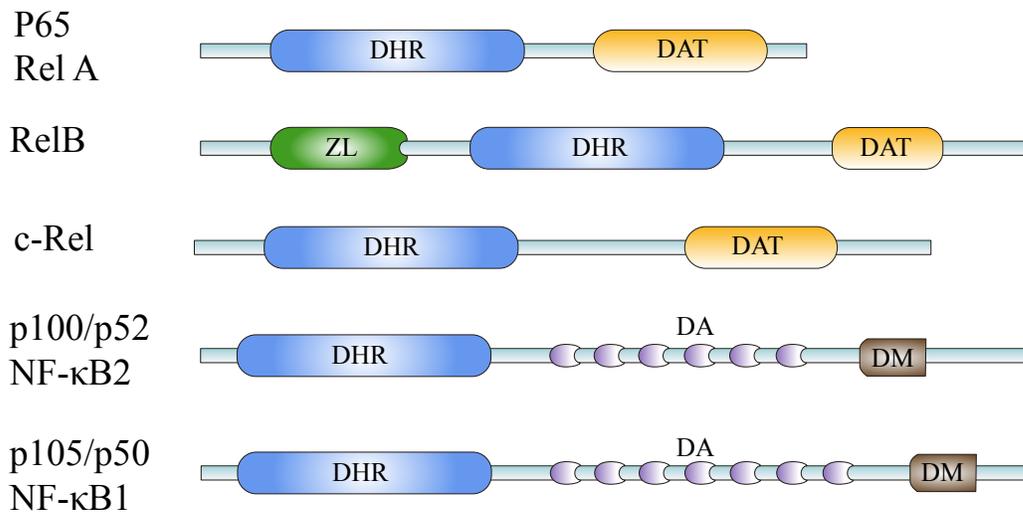
Se ha reportado que alteraciones de las vías de señalización como Hedgehog, Notch, Wnt regulan características de las CTTs tales como la autorrenovación, proliferación, diferenciación, así como prevención de la apoptosis de esta población celular en diversos tipos tumorales (Merchant & Matsui, 2010; Pannuti et al., 2010; Takahashi-Yanaga & Kahn, 2010). Otra de las vías de señalización que también podría jugar un papel esencial en el mantenimiento de las CTTs es la vía de NF- $\kappa$ B, sin embargo dada su complejidad aún no se ha determinado cual es el mecanismo preciso por el cual actúa en este tipo celular.

### **3.7 La vía de señalización del Factor Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y su participación en cáncer**

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), fue descubierto por primera vez como un regulador de la cadena ligera kappa de los linfocitos B (Sen & Baltimore, 1986). Se ha descrito que NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en diversos procesos celulares directamente asociados con el inicio, progresión y desarrollo del cáncer mediante la regulación de la expresión de numerosos genes (Ghosh & Karin, 2002; Karin & Ben-Neriah, 2000). NF- $\kappa$ B engloba una familia constituida por cinco factores de transcripción que incluyen a RelA(p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), los cuales

contienen dominios homólogos y forman entre ellos homo o heterodímeros. Los dímeros son los que regulan la expresión de genes, tal como, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular, reguladores de apoptosis (miembros de la familia BCL2, IAPs), genes involucrados en proliferación (ciclinas, factores de crecimiento), entre otros (Baldwin, 1996; Ghosh, May, & Kopp, 1998). Los miembros de la familia NF- $\kappa$ B comparten en su extremo amino terminal (N-terminal) un dominio conservado de homología a Rel (DHR) de aproximadamente 300 aminoácidos, el cual contiene residuos requeridos para la unión a ADN, dimerización, localización nuclear y unión a inhibidores (inhibidores miembros de la familia I $\kappa$ B) (Hayden & Ghosh, 2008; Perkins & Gilmore, 2006).

Las subunidades RelA, RelB y c-Rel de NF- $\kappa$ B, son sintetizadas como proteínas maduras, poseen un dominio de activación transcripcional (DAT), el cual se localiza en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) (Hoffmann, Natoli, & Ghosh, 2006). RelB, además del dominio DAT, requiere de un dominio o zipper de leucinas en el extremo N-terminal para ser completamente activo (Dobrzanski, Ryseck, & Bravo, 1993). En contraste, las subunidades p50 y p52 no contienen el dominio DAT y se distinguen por ser sintetizadas como proteínas precursoras p105 y p100, respectivamente. Asimismo, estas subunidades contienen repeticiones de anquirina (DA) que se encuentran en el extremo C-terminal (Figura 5), los cuales confieren una función parecida a los inhibidores de I $\kappa$ B, debido a que secuestran a estas subunidades en el citoplasma. Para poder translocarse a núcleo y ser activas transcripcionalmente p105 y p100 necesitan un procesamiento parcial por el proteosoma (Christian, Smith, & Carmody, 2016; Hayden & Ghosh, 2012; Karin & Ben-Neriah, 2000).

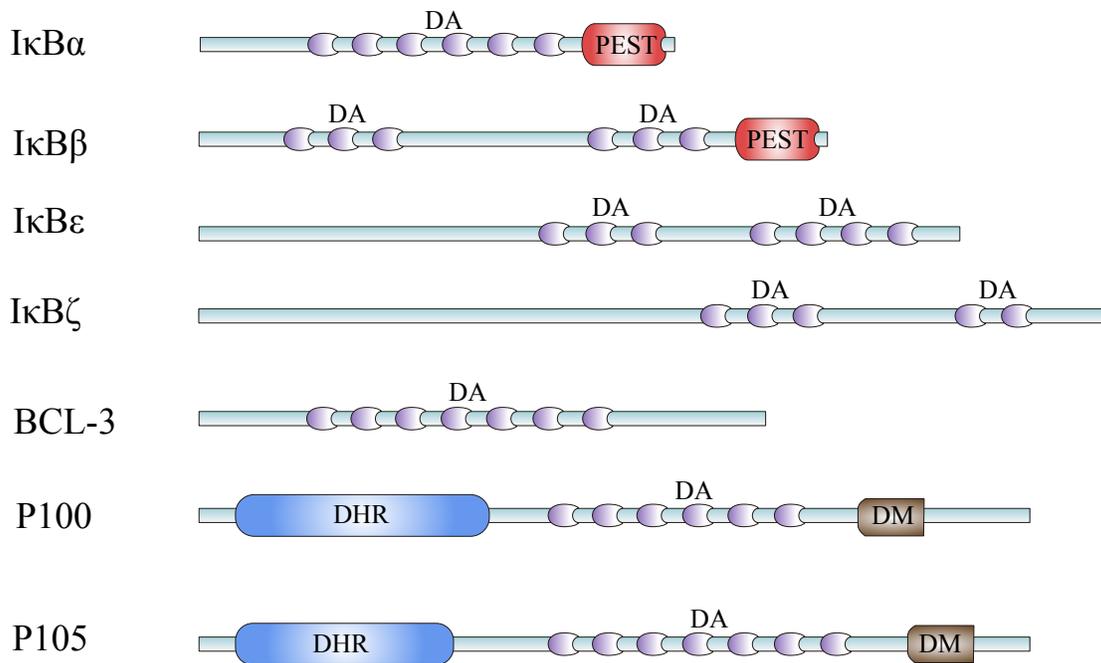


**Figura 5. Proteínas de la familia NF-κB.** Representación esquemática de los 5 miembros de la familia NF-κB, los cuales contienen sus dominios de homología a Rel. Solo tres miembros de la familia RelA, RelB y c-Rel, presentan un dominio de activación transcripcional. RelB es el único miembro con zipper de leucina. Las proteínas p105 y p100 presentadas como proteínas precursoras de p50 y p52 poseen sus dominios de anquirina. DHR: dominio de homología a Rel; DAT: dominio de activación transcripcional; ZL: zipper de leucina; DA: dominios de anquirina; DM: dominio de muerte. Tomado y modificado de Oeckinghaus et al. 2009 (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Las proteínas p50 y p51 a pesar de que carecen de actividad transcripcional debido a que no poseen dominio DAT, al unirse con otras proteínas de la familia NF-κB, pueden formar diferentes heterodímeros transcripcionalmente activos como RelA:p50; RelB:p52; c-Rel:p50 (O'Dea & Hoffmann, 2010; Saccani, Pantano, & Natoli, 2003; Siebenlist, Franzoso, & Brown, 1994). La composición del dímero de NF-κB puede variar dependiendo del tipo celular, la naturaleza del estímulo y del tiempo que transcurre después de exposición a un estímulo (Perkins & Gilmore, 2006).

Los diferentes dímeros son retenidos en el citoplasma como precursores inactivos formando un complejo al interactuar con diferentes inhibidores, como las proteínas de la familia IκBs

(inhibidores de kB) las cuales incluyen IκBα, IκBβ e IκBε, IκBζ, Bcl-3, p100 y p105 (Figura 6). Todas las proteínas IκB poseen de cinco a siete motivos repetidos de anquirina (DA) en el extremo C-terminal, los cuales interactúan con el dominio DHR de las proteínas NF-κB con el fin de enmascarar su señal de localización nuclear (O'Dea & Hoffmann, 2010; Oeckinghaus & Ghosh, 2009). La forma en como los dímeros de NF-κB pueden ser activados, es a través de estímulos específicos, que inducen la degradación de los inhibidores IκB, lo que provoca que estos puedan translocarse al núcleo y unirse a sus secuencias consenso (κB), generando la regulación transcripcional de sus genes blanco (Christian et al., 2016; DiDonato et al., 1996; O'Dea & Hoffmann, 2010).



**Figura 6. Proteínas inhibidoras κB.** Representación esquemática de la familia de proteínas inhibidoras de NF-κB. Estas proteínas mantienen inhibidos y secuestrados a los dímeros de NF-κB a través de sus dominios de anquirina. Los dominios de anquirina en las proteínas p100 y 105 precursoras de p50 y p52, también funcionan como inhibidores. DA: dominios de anquirina; PEST: región rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina; DHR: dominio de homología a Rel; DM:

domino de muerte. Tomado y modificado de Oeckinghaus et al. 2009 (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

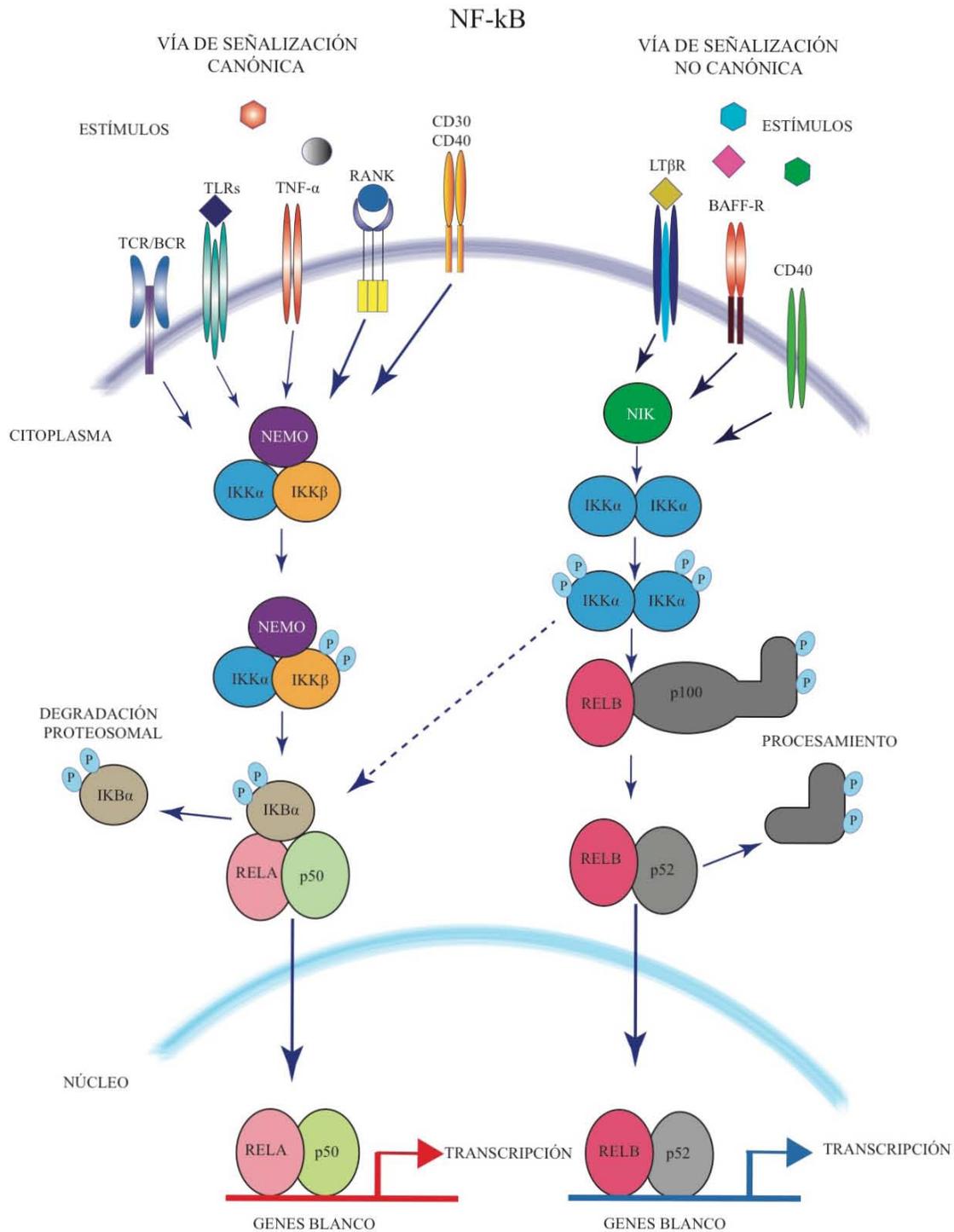
La activación de NF- $\kappa$ B ocurre mediante dos grandes vías, la canónica o clásica y la no canónica o alternativa, las cuales se activan en respuesta a una amplia variedad de estímulos celulares a través de la unión de ligandos y sus receptores de membrana, desencadenando su translocación del citoplasma al núcleo.

Se ha reportado que la vía canónica es activada por diversas moléculas que incluyen citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF $\alpha$ , moléculas asociadas al reconocimiento de patógenos que se unen a TLR, correceptores de linfocitos como CD30, CD40 o activadores de receptores de NF- $\kappa$ B (RANK del inglés *receptor activator of NF- $\kappa$ B*), entre muchos otros. La unión del estímulo o ligando a su receptor conduce a la formación de un complejo conformado por las cinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y la subunidad reguladora IKK $\gamma$  (NEMO), que fosforila al inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos de serina 32 y 36 localizadas en el extremo N-terminal. Esta fosforilación induce una rápida degradación vía proteosoma de I $\kappa$ B $\alpha$ , lo que permite la translocación al núcleo y activación del dímero p50/RelA (p50/p65), para así unirse a sus secuencias blanco y controlar la transcripción (Shih, Tsui, Caldwell, & Hoffmann, 2011).

La activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B se lleva a cabo por un grupo restringido de receptores de superficie que pertenecen a la superfamilia de receptores TNF, los cuales incluyen CD40, el receptor de linfotóxina  $\beta$  (LTBR del inglés *Lymphotoxin Beta Receptor*), y el receptor BAFFR (Bonizzi & Karin, 2004). Asimismo, se ha reportado la participación del receptor RANK en la activación de esta vía, mediante la unión a los ligandos LTBR, CD40L, BAFF, RANKL, entre otros. Todos estos receptores se han implicado en el

proceso de organogenesis linfoide (Razani, Reichardt, & Cheng, 2011). La vía no canónica se inicia una vez que el ligando se une a su receptor, esto conduce al reclutamiento de proteínas de la familia TRAF, particularmente TRAF2 y TRAF3, las cuales son degradadas permitiendo la activación y estabilización de la cinasa inductora de NF-kB (NIK del inglés *NF-kappaB inducing kinase*) (S. C. Sun, 2010). A su vez, NIK permite la formación y activación del homodímero de cinasas IKK $\alpha$ , el cual fosforila e induce el procesamiento de p100, es decir, el homodímero induce la fosforilación del C-terminal de p100 y su proteólisis parcial, resultando en la liberación y posterior activación del heterodímero p52/RelB, el cual se transloca al núcleo para actuar sobre sus genes blanco (Perkins & Gilmore, 2006; S. C. Sun, 2011) (Figura 7).

Se ha reportado que en un gran número de tumores la vía NF-kB está activa e involucrada en diversos procesos celulares entre ellos el control de proteínas que regulan el ciclo celular, así como la sobrevivencia de las células tumorales a través de la regulación negativa de la apoptosis por la activación de genes como Bcl2, IAPs y cFLIP, entre otras. A su vez, participa en la regulación de la expresión de metaloproteasas de matriz extracelular. Por lo que se ha destacado la participación de este factor de transcripción en la progresión del tumor, ya que regula la expresión de metaloproteasas de matriz extracelular, la producción de factores angiogénicos todo esto implicado en la migración de células tumorales a órganos específicos. En este sentido se ha demostrado que en respuesta a la activación de NF-kB se expresan ICAM-1, ELAM-1 y VCAM-1, moléculas importantes que dirigen el proceso de migración de las células tumorales.



**Figura 7. Esquema general de la activación de las vías de señalización canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B.** La vía canónica (izquierda) inicia con la activación del complejo IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ ), el cual fosforila a las proteínas I $\kappa$ B inhibitoras de NF- $\kappa$ B, provocando su ubiquitinación y

degradación vía proteosoma. Esto permite la liberación de los heterodímeros de NF- $\kappa$ B. La vía no canónica, (derecha) depende de la activación de la cinasa NIK, esta fosforila al dímero IKK $\alpha$ , el cual promueve la degradación parcial del extremo carboxilo de p100, una vez procesado libera a los heterodímeros de NF- $\kappa$ B. Estas dos vías conducen a la translocación de los dímeros de NF- $\kappa$ B al núcleo, los cuales generan la transcripción de múltiples genes blancos. Se observa que las dos cascadas de señalización convergen en la cinasa IKK $\alpha$ .

### **3.8 NF- $\kappa$ B y células troncales tumorales**

Se ha demostrado que en las CTTs de leucemia mieloide aguda, de cáncer de mama, de cáncer de próstata y de cáncer de ovario, la actividad de NF- $\kappa$ B es constitutiva (Birnie et al., 2008; Guzman et al., 2001; Murohashi et al., 2010; Pratt et al., 2009). Alvero y colaboradores mostraron que CTTs aisladas de tumores de pacientes con cáncer de ovario, que presentaban fenotipo CD44+MYD88+, tienen la habilidad para replicar *in vivo* el tumor original, alta capacidad de reparación del ADN y resistencia a apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), así como la expresión constitutiva de NF- $\kappa$ B (Alvero et al., 2009).

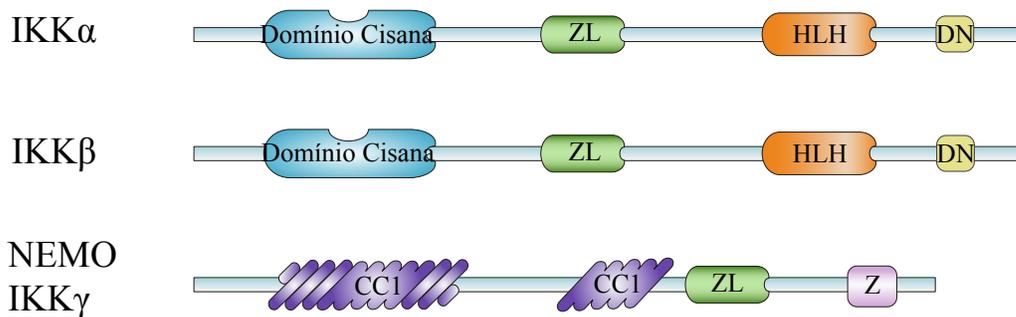
Más recientemente, se demostró que NF- $\kappa$ B participa de manera activa en la supervivencia de las células CTTs de ovario, ya que al exponer estas células a Eriocalaxina B, un químico que inhibe la vía de NF- $\kappa$ B, adquieren sensibilidad ante un estímulo apoptótico, desencadenando su muerte asociada con activación de caspasas. A su vez, también se observó en estas células que ante la presencia de este compuesto químico hay pérdida de translocación de p65 al núcleo, así como, la disminución del gen anti-apoptótico XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) (Leizer et al., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que posterior al daño tumoral se activa la vía de NF- $\kappa$ B a través de la activación del receptor TLR2 provocando la autorrenovación de las CTTs de ovario (Chefetz et al., 2013).

Consistente con estos datos, se ha demostrado en otros tipos de cáncer, como en el caso de cáncer de mama y glioblastoma (Lee et al., 2013; W. Zhang et al., 2013), que las señalizaciones de NF-kB canónica y no canónica, contribuyen con las habilidades de la población de CTTs en el mantenimiento de los diversos tumores (Cogswell, Guttridge, Funkhouser, & Baldwin, 2000; Kendellen, Bradford, Lawrence, Clark, & Baldwin, 2014; M. Liu et al., 2010). Por ejemplo, en CTTs de mama se ha demostrado que la inhibición de NF-kB inducida por el compuesto químico Dehidroximetilopoxiquinomicina (DHMEQ), disminuye su potencial tumorigénico al ser trasplantadas en ratones desnudos (Murohashi et al., 2010). Asimismo, Liu y colaboradores determinaron el papel de NF-kB en la tumorigénesis de las CTTs de mama en condiciones *in vivo*, mediante el desarrollo de un modelo animal que permite la represión de forma inducible de la actividad de NF-kB, teniendo como blanco específico la glándula mamaria. Al inhibir a NF-kB, en este modelo observaron una disminución en la formación de tumores de aproximadamente 50%. Al emplear células derivadas de tumores de los ratones transgénicos y realizar ensayos de clonogenicidad observaron que las CTTs con inhibición de NF-kB forman un menor número de colonias comparándolas con los controles. A su vez, determinaron que los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un gen importante en el proceso de angiogénesis, estaban reducidos en los tumores con inhibición de NF-kB (M. Liu et al., 2010).

Por otra parte, en cáncer de próstata, estudios funcionales empleando Partenolide (PTL), inhibidor de NF-kB, también han demostrado que las CTTs pierden su capacidad de evadir la apoptosis (Birnie et al., 2008). Estas evidencias sugieren un importante papel de NF-kB en el mantenimiento de las CTTs.

### 3.9 Cinasa I-kB alfa (IKK $\alpha$ )

Una proteína clave en la activación de ambas vías de NF-kB, es la cinasa de serina y treonina I-kB alfa (IKK $\alpha$  / IKK1), previamente conocida como CHUK, la cual pertenece a la familia de proteínas IKK. Esta proteína se expresa de manera ubicua y posee en el extremo N-terminal su dominio cinasa además de un zipper de leucina, el cual es responsable de la dimerización de la enzima. En el extremo C-terminal presenta un dominio hélice-bucle-hélice (HLH del inglés *helix-loop-helix*), el cual es esencial para su actividad óptima de cinasa (Zandi, Chen, & Karin, 1998) (Figura 8).



**Figura 8. Familia de proteínas IKK.** Representación esquemática de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y NEMO. IKK $\alpha$  y IKK $\beta$  poseen un dominio cinasa y un dominio hélice-bucle-hélice, además de un dominio de unión a Nemo para formar el complejo IKK activo en la vía canónica de NF-kB. Nemo no posee actividad cinasa., ZL: zipper de leucina; HLH: dominio hélice-bucle-hélice DN: dominio de unión a NEMO. Tomado y modificado de Oeckinghaus et al., 2009.

Esta proteína está implicada en el crecimiento y mantenimiento de varios tipos de cáncer y también se ha reportado que es un impulsor importante del proceso metastásico (Affara & Coussens, 2007). Se ha descrito la asociación entre la señalización de IKK $\alpha$  con el potencial metastásico del cáncer a través de un modelo de cáncer de próstata, en el cual la

activación de esta cinasa, reprime la expresión del gen supresor metastásico maspina (J. L. Luo et al., 2007). Además de estos trabajos, se ha determinado que el desarrollo y proliferación de la glándula mamaria a través de la expresión de ciclina D1, es dependiente de la activación de IKK $\alpha$  (Karin, Cao, Greten, & Li, 2002). Asimismo, se ha determinado que la introducción genética de una molécula no activable de IKK $\alpha$ , en el modelo de cáncer de mama el cual es inducido en ratón y dirigido por Neu/ErbB2, significativamente retarda el desarrollo del tumor (Cao, Luo, & Karin, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la inactivación de IKK $\alpha$  bloquea la capacidad del tumor inducido por Neu/ErbB2 para generar trasplantes de tumores secundarios en modelos ortotrópicos e inhibe la capacidad de autorrenovación de los progenitores del cáncer de mama (S. Singh et al., 2007).

Hay evidencia que sugiere que IKK $\alpha$  juega un papel importante en el fenotipo troncal, ya que se ha observado que su inhibición promueve la diferenciación de células troncales embrionarias en neuroectodermo (Luningschror, Kaltschmidt, & Kaltschmidt, 2012). Además, la actividad de IKK $\alpha$  es requerida por los tumores de mama inducidos por ErbB2, ya que se demostró que participa en la expansión de CTTs.

Por otra parte, se ha reportado que cuando se activa IKK $\alpha$  entra al núcleo y fosforila a p27/Kip1, el cual es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), lo que provoca su salida del núcleo y baja en su expresión, permitiendo que las CTTs retomen su actividad de autorrenovación. Por lo que la expresión de IKK $\alpha$  en cáncer de mama es asociada con la disminución en la abundancia nuclear de p27 y la supervivencia de los pacientes (W. Zhang et al., 2013).

Se ha reportado que la vía de señalización Notch desempeña un papel clave en el mantenimiento de CTTs en células de cáncer de ovario (McAuliffe et al., 2012) y

particularmente en cáncer cervicouterino y de mama se ha reportado que Notch-1 se asocia y regula la actividad de IKK $\alpha$ , lo cual se observó a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (Hao et al., 2010; Song et al., 2008).

De tal manera que IKK $\alpha$  posee múltiples funciones nucleares involucradas en la regulación de la expresión de genes blanco de la vía canónica y no canónica de NF-kB, además de ser una cinasa que se asocia a la cromatina (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). También se ha reportado que IKK $\alpha$ , se ha encontrado diferencialmente expresada en poblaciones de CTT y no CTTs de algunos tipos celulares como carcinoma de células escamosas (Quan et al., 2018).

Por lo que estudiar su posible participación e implicación en la regulación del fenotipo de las CTTs de ovario resulta de gran relevancia, ya que hasta ahora su contribución no es bien entendida.

Como parte de este trabajo primero se identificó la presencia de proteínas de las dos vías de activación NF-kB, incluyendo a la cinasa IKK $\alpha$ . Posteriormente estas proteínas fueron reguladas diferencialmente en CTTs de una línea de células de cáncer de ovario, para determinar su papel en el mantenimiento de su fenotipo.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La presencia de las CTTs en los tumores desempeña un papel muy importante para su mantenimiento, progresión y resistencia. En los últimos años se han relacionado alteraciones en las vías de señalización con el establecimiento del fenotipo de esta subpoblación de células tumorales. Tal es el caso de la vía de NF- $\kappa$ B, la cual se ha relacionado con diversos procesos como la autorrenovación y supervivencia de las CTTs de diversos tumores. El papel que juega NF- $\kappa$ B en CTTs de ovario aun es poco entendido, de hecho se desconoce si las dos vías de activación canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B se encuentran activas en esta población. Más aun, el papel que puedan desempeñar de forma independiente las moléculas que conforman estas vías como es el caso de la cinasa IKK $\alpha$  aun no se ha descrito. Por lo tanto, en este trabajo de tesis se decidió estudiar la participación de la vía de activación de NF- $\kappa$ B tanto canónica como no canónica y la proteína IKK $\alpha$  en el mantenimiento del fenotipo de CTTs de una línea de células de cáncer de ovario.

## **V. JUSTIFICACIÓN**

El estudio de las células troncales de cáncer de ovario es muy importante, debido a que esta neoplasia, se caracteriza por tener un alto porcentaje de recurrencia y quimioresistencia. De hecho, sólo un 15% de los pacientes responden finalmente a quimioterapia y cirugía.

Dadas las características asociadas al cáncer de ovario, es importante realizar la caracterización de su población de células troncales tumorales con la finalidad de determinar los eventos moleculares específicos que permitan su identificación *in vivo*, esto ayudara en la detección temprana de esta enfermedad y permitirá el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para combatirla.

## **VI. HIPÓTESIS**

Las células troncales de cáncer de ovario presentarán modificaciones en las dos vías de NF- $\kappa$ B, las cuales están implicadas en mantener el fenotipo troncal que involucra características tales como, la autorrenovación y la presencia de genes de troncalidad.

## **VII. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la activación de las vías canónica y no canónica de NF-kB contribuyen al mantenimiento del fenotipo de células troncales de ovario.

### **7.1 Objetivos particulares**

- I. Identificar y aislar células troncales tumorales a partir de la línea celular de cáncer de ovario SKOV3.
  
- II. Establecer si la vía canónica y no canónica de activación de NF-kB están presentes y son funcionales en células troncales tumorales aisladas de la línea celular de ovario SKOV3.
  
- III. Determinar si las dos vías de activación de NF-kB participan en el mantenimiento de las células troncales tumorales derivadas de la línea celular de cáncer de ovario SKOV3.

## **VIII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Línea celular y condiciones de cultivo**

La línea celular de cáncer de ovario SKOV3 fue obtenida de ATCC y se mantuvo en condiciones de cultivo como monocapa utilizando Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM- Gibco BRL, MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, MD, USA), las condiciones de incubación fueron en 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **8.2 Análisis de citometría de flujo**

Las células se mantuvieron en las condiciones de cultivo antes mencionadas hasta alcanzar 80% de confluencia a los 2 o 3 días en placas de 100 mm, se resuspendieron 1x10<sup>6</sup> células por mililitro, para marcarlas y leerlas mediante citometría de flujo. Brevemente las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos seguido de fijación con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, después de dos ciclos de lavado, las células se resuspendieron en SFB al 1% en PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo CD44-FITC [dilución 1:11 - Mouse anti-human CD44:FITC (BD Pharmingen, CA, USA)] por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS 1X. El anticuerpo IgG1-FITC fue usado como control de isotipo (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Los datos de citometría de flujo fueron obtenidos por el análisis de más de 1 x 10<sup>4</sup> células para cada muestra en un sorter FACS Aria (BD Biosciences, CA, USA).

La separación celular por citometría de flujo (FACS) se realizó con 3 x 10<sup>7</sup> células para cada muestra. Las células fueron resuspendidas en SFB al 1% en PBS 1X seguidas de incubación con el anticuerpo CD44-FITC (dilución 1:11) por 30 minutos en hielo.

Únicamente las células CD44+ y CD44- fueron separadas con base en la positividad de CD44 y posteriormente ambas poblaciones fueron sembradas en placas independientes.

Se determinó el porcentaje de células con doble marcaje positivas para CD44 y CD133 en la línea celular SKOV3, mediante el uso del anticuerpo CD133 [dilución 1:11 - Mouse anti-human CD133:APC (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)] se siguió el procedimiento descrito para el anticuerpo CD44.

### **8.3 Aislamiento de ARN y Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Se extrajo ARN total de las células mediante la técnica de TRIzol (Life Technologies, TX, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se evaluó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa como se ha reportado previamente (Masek, Vopalensky, Suchomelova, & Pospisek, 2005), posteriormente cada muestra fue cuantificada por Nanodrop (Thermo Scientific, USA) y se determinó su pureza usando la relación 260/280nm. La transcripción reversa del ARN se realizó usando el Kit de síntesis High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA), siguiendo las instrucciones de fabricante para obtener ADN complementario (ADNc). Los genes de interés fueron amplificados usando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, CA, USA). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y observados mediante tinción con bromuro de etidio.

#### **8.4 PCR semicuantitativo y cuantitativo**

El nivel de expresión de cada gen fue determinado por PCR semi-cuantitativo y en tiempo real o cuantitativo (qPCR) usando SYBR Green (Thermo Scientific, IL, USA). El PCR cuantitativo fue realizado empleando el equipo QuantStudio 7 (Applied Biosystems by Thermo Scientific, CA, USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, seguidos por 45 ciclos de PCR (95°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 30 seg), seguido de un ciclo adicional diseñado por el software del equipo QuantStudio 7 (95°C por 60 seg, 55°C por 30 seg y 95°C por 30 seg), este ciclo se agregó con el objetivo de analizar la “curva de disociación” de los productos amplificados. La secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación del ADNc (sentido y antisentido) para PCR y qPCR se describe en información suplementaria (Anexo 12.1 Tabla 1). La expresión media del gen TBP (proteína de unión a caja TATA) que fue usado como el control interno en todas las reacciones se empleó para normalizar la variabilidad en los niveles de expresión de los genes. Los resultados fueron analizados por el método 2 delta-delta CT ( $2 \Delta\Delta CT$ ), para calcular los niveles de expresión de los genes. Las gráficas de los resultados incluyen la desviación estándar (SD) de tres réplicas biológicas independientes.

#### **8.5 Ensayo de clonogenicidad por agar suave**

La tumorigenicidad *in vitro* y el crecimiento independiente de anclaje fue determinado mediante ensayo de formación de colonias. Para esto, se sembraron  $1 \times 10^4$  células suspendidas en medio DMEM con 0.3% de agarosa de bajo punto de fusión y 5% de SFB, las células se colocaron en cajas de cultivo de 35 mm recubiertas con 1% de agarosa de bajo punto de fusión. Las cajas de cultivo fueron colocados en condiciones de incubación de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 semanas y posteriormente las colonias que se formaron

fueron teñidas con cristal violeta al 0.01% por 30 minutos. Las colonias visibles fueron contadas bajo microscopio de contraste de fases.

### **8.6 Ensayo de formación de colonias**

Un número de  $1 \times 10^3$  células CD44+ y CD44- se sembraron en los primeros pozos de placas de cultivo de 48 pozos, seguidos de diluciones seriales 1:2 en el resto de los pozos. Las células fueron incubadas para formar colonias de 1 a 3 semanas, y posterior a este tiempo de cultivo, se fijaron con etanol al 70%, se tiñeron con cristal violeta al 1% y se contaron. Todos los experimentos incluyeron tres réplicas biológicas independientes.

### **8.7 Ensayo de formación de ovoesferas**

Un número de  $1 \times 10^5$  células CD44+ y CD44- fueron colocadas en botellas de cultivo no adherentes en medio Leibovitz L-15 (Gibco BRL, Rockville MD) suplementado con 5% de SFB. Las condiciones de cultivo incluyeron movimiento orbital con temperatura de 37°C por 15 días, con cambio de medio cada 3 días. El diámetro de los esferoides se determinó empleando imágenes tomadas del microscopio óptico AxioCamp (Zeiss). El volumen de 10 esferoides fue calculado usando la fórmula  $V = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b \cdot c$  (Yuhas, Li, Martinez, & Ladman, 1977). Se realizaron pases seriados de las ovoesferas cada 8 a 15 días, para lo cual se disgregaron las ovoesferas con Acutasa (Chemicon, VA, USA). Las células disgregadas se contaron y se sembraron nuevamente, iniciando los cultivos con el mismo número de células en cada pase para la formación de nuevas ovoesferas. Este proceso se repitió por 3 ocasiones.

### **8.8 Ensayo de tumorigenicidad *in vivo***

Para los ensayos en condiciones *in vivo*, se emplearon ratones desnudos inmunodeficientes nu/nu hembras de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos y mantenidos en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, siguiendo los lineamientos éticos de cuidados animales aprobados por la “Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales” (SAGARPA-número de aprobación AUT-B-C- 0215-016). La tumorigenicidad fue probada por inyección subcutánea de  $1 \times 10^5$  células CD44+ y CD44- en 200 $\mu$ l de 1:1 Matrigel:PBS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Los ratones control se inyectaron solo con Matrigel:PBS. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y el crecimiento del tumor fue monitoreado cada 3 días durante 3 semanas. Después de este tiempo los ratones fueron sacrificados para retirar los tumores. Los tumores fueron lavados con PBS 1X y fijados con paraformaldehído al 4% para examinarlos histológicamente (Tinción H&E). Todas las cirugías fueron realizadas bajo anestesia con pentobarbital y técnicas quirúrgicas especializadas para minimizar el sufrimiento de los animales de laboratorio.

### **8.9 Inmunofluorescencia de células troncales de cáncer ovario**

Las células CD44+ y CD44- fueron sembradas en portaobjetos de permanox multipozos (Chamber Slide, Lab-Tek, Nunc Sigma Aldrich, USA) por 48 horas, las condiciones de incubación fueron en 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 15 minutos. Después de esto, los portaobjetos fueron lavaron con PBS 1X y se bloquearon con albúmina al 1% por 1 hora. La incubación con los anticuerpos primarios anti-RelA y anti-RelB se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C y después de 12 horas, las laminillas se lavaron con PBS 1X y

se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (Millipore, Bedford, MA, USA). Finalmente, los portaobjetos con las células fueron montados en solución para fluorescencia con DAPI (Vectashield) y se almacenaron a 4°C hasta su posterior observación. El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio confocal (Carl Zeiss). Las fotografías fueron tomadas con el mismo tiempo de exposición.

### **8.10 Análisis de expresión por fluorescencia de micrografías**

Los análisis de expresión de las proteínas RelA y RelB en las micrografías de fluorescencia en la población de células CD44- y CD44+ de línea SKOV3 fueron realizadas con el software ImageJ 1.33 como esta descrito por McCloy y colaboradores (McCloy et al., 2014).

### **8.11 Análisis de proteínas por Western blot**

Para la extracción de proteínas, las células fueron despegadas usando una espátula de silicón, seguidas de dos lavados con PBS 1X y centrifugación durante 5 minutos por 2000 rpm 4°C. El botón celular se incubó en buffer de lisis RIPA (1% IGEPAL, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% SDS – Upstate Biotechnology, Inc, New York, USA), suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo Inhibidor de proteasas (PMSF) 100 mM. El lisado se centrifugó a 10,000g por 20 minutos y se almacenó a -20°C hasta su uso. Las proteínas (20 µg) fueron separadas por electroforesis en 10% de SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, USA). Las membranas fueron incubadas en TBS-Tween-20 al 0.1% (TBS-T) con 5% de leche libre de grasas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, cada membrana fue incubada toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Después de 12 horas, las membranas fueron

lavadas cuatro veces con TBS-T por 15 minutos e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con HRP por 1 hora a temperatura ambiente (Promega, Madison, USA). Finalmente las membranas fueron lavadas con TBS-T cuatro veces por 30 minutos y la unión del anticuerpo se detecto por una reacción de quimioluminiscencia con el kit Western Immobilon (Millipore). La quimioluminiscencia fue detectada usando el equipo Versa Doc Imaging System (Bio-Rad, CA, USA). Los anticuerpos primarios usados fueron: RelB (Sc-28689); p65 (Sc-372); p52 (Sc-848); IκBα (Sc-371) p-IκBα (Sc-8404); IKKα (Sc7182); GAPDH (Sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA), y los secundarios: anti-Rabbit IgG-HRP (W401B); Anti mouse IgG HRP (W402B, Promega Corporation Fitchburg, USA).

## **8.12 Modulación de la vía de NF-κB**

Para inhibir la actividad de NF-κB en las células SKOV3, se sembraron en placas de 6 pozos un día antes de realizar la transfección. Las células fueron transfectadas con 2 ug de un plásmido que posee una versión negativa del inhibidor I-κBα (mutado en I-κBα-S32/ I-κBα S36), donado por el Dr. P. Bauerle (Universidad de Munich) y la clona fue nombrada SKOV3-IκBαDN. Como control negativo, se empleo el vector vacío PLXSN (Mock) y la clona fue nombrada SKOV3-PLXN. Después de 24 horas de incubación con el plásmido, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco suplementado con el antibiótico G418 (GIBCO, Life technologies, USA), ya que el plásmido contiene el gen que confiere resistencia a este antibiótico

Las células estables fueron seleccionadas después de 4 semanas de incubación con 900 µg/ml de G418, y la expresión de proteínas específicas y de ARN fue verificada por Western blot y RT-PCR respectivamente en las clonas transfectadas.

### **8.13 Análisis de actividad de la vía de NF-kB mediante el ensayo de gen reportero**

Para determinar la actividad de NF-kB, las clonas transfectadas previamente SKOV3-IkBaDN y SKOV3-PLXN fueron co-transfectadas usando Lipofectamina LTX con el vector reportero pNF-kB-MetLuc2 (Clontech), usando el vector SEAP2 (Clontech,CA) como control de normalización. Para medir la actividad de NF-kB se empleó el kit Ready Glow Secreted Luciferase Reporter Assay (Clontech, CA). La fosfatasa alcalina embrionica secretada (SEAP) fue cuantificada usando el kit Great Escape SEAP Chemiluminescence 2.0 (Clontech, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para determinar la luminiscencia se empleó un detector multimodal DTX880 (Beckman Coulter, CA). Se realizaron tres ensayos biológicos independientes por cada punto. Todos los ensayos con TNF $\alpha$ , el cual es un ligando que se sabe activa a la vía de NF-kB, fueron realizados usando un concentración de 10 ng/ml de la citocina.

### **8.14 Ensayos de tumorigenicidad en pez cebra**

Se realizaron ensayos de tumorigenicidad en la línea celular con inhibicion de la vía de NF-kB (SKOV3-IkBaDN) y la línea control (SKOV3-PLXN) en la cepa silvestre del Pez Cebra (*Danio rerio*) con fondo genómico AB (donado por la Doctora Hilda Lomely del IBT-UNAM), la cual se mantuvo en un ambiente con temperatura de 28.5°C, pH de 7.2-7.4, y ciclos de luz de 14 horas y de 10 horas de oscuridad. Los embriones del pez cebra se obtuvieron mediante cruza y posteriormente se mantuvieron a temperatura de 28.5°C en

medio embrionario (EM). Los experimentos de xenotrasplantes se realizaron en el saco vitelino embrionario, utilizando embriones de dos días post-fecundación (dpf) previamente decorionizados y anestesiados con tricaina (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de xenotrasplantes se utilizaron diluciones de células SKOV3-PLXSN y SKOV3-IkBaDN, las cuales se resuspendieron a una concentración de  $10^6$  células/100  $\mu$ l y se realizaron curvas de crecimiento microinyectando 50, 100 y 200 células. Aproximadamente fueron microinyectados por condición experimental de ambas poblaciones celulares grupos de 20 embriones, los cuales fueron revisados cada tres días después de la inyección (Dpi: días post inyección) para evaluar la formación de tumores, estos ensayos fueron documentados mediante registro fotográfico. Se siguieron las condiciones Husbandry como recomendaciones normales, el agua de los peces se cambió diariamente durante el tiempo de los ensayos, y las larvas que sobrevivieron por más de 5 días se les alimento dos veces al día con camarones molidos. Los ensayos de dilución limitante *in vivo* se analizaron utilizando el software de ensayos de dilución limitante (ELDA) que emplea un modelo lineal generalizado usado para comparar frecuencias de células activas en poblaciones celulares, lo que permitio determinar las diferencias significativas entre las poblaciones analizadas.

### **8.15 Construcción y transfección de short hairpin RNA (shRNA)**

Para inhibir la expresión de IKK $\alpha$  se diseñaron dos shRNA. Las secuencias de los oligonucleotidos usadas para codificar los shRNAs dirigidos contra IKK $\alpha$ 1 o IKK $\alpha$ 2 fueron: shRNA- IKK $\alpha$ 1: 5'-GTGATAGCTATATGGTTTA-3 ; shRNA- IKK $\alpha$ 2: 5'-GTGCCATTGATCTATATAA-3, los oligonucleótidos fueron obtenidos de la compañía Integrated DNA Technologies (IDT) y fueron clonados en un vector pSIREN (Clontech,

CA, USA). Un shRNA dirigido contra luciferasa (shRNA-Luc) fue empleado como control. Las células SKOV3 fueron sembradas en placas de 6 pozos, después de 1 día de incubación fueron transfectadas con 2  $\mu$ g de cada plásmido con Lipofectamina LTX (LTX Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas de incubación el medio de transfección fue reemplazado con medio fresco. La expresión de IKK $\alpha$ 1 y IKK $\alpha$ 2 fueron determinados 48 horas después de la transfección transitoria. Se realizaron dos réplicas biológicas.

### **8.16 Análisis estadístico**

Los resultados son presentados como la media y desviación estándar: las barras de error son representativas de tres experimentos independientes (réplicas biológicas). El software Prism versión 5.0c (GraphPad, Inc.) fue usado para realizar el análisis estadístico. Los valores de las medias de dos grupos fueron comparados por la prueba estadística *t*-Student no pareada. La significancia estadística fue establecida para  $p < 0.05$ . El valor de  $p$  se presenta en las figuras, donde es aplicable.

## **IX. RESULTADOS**

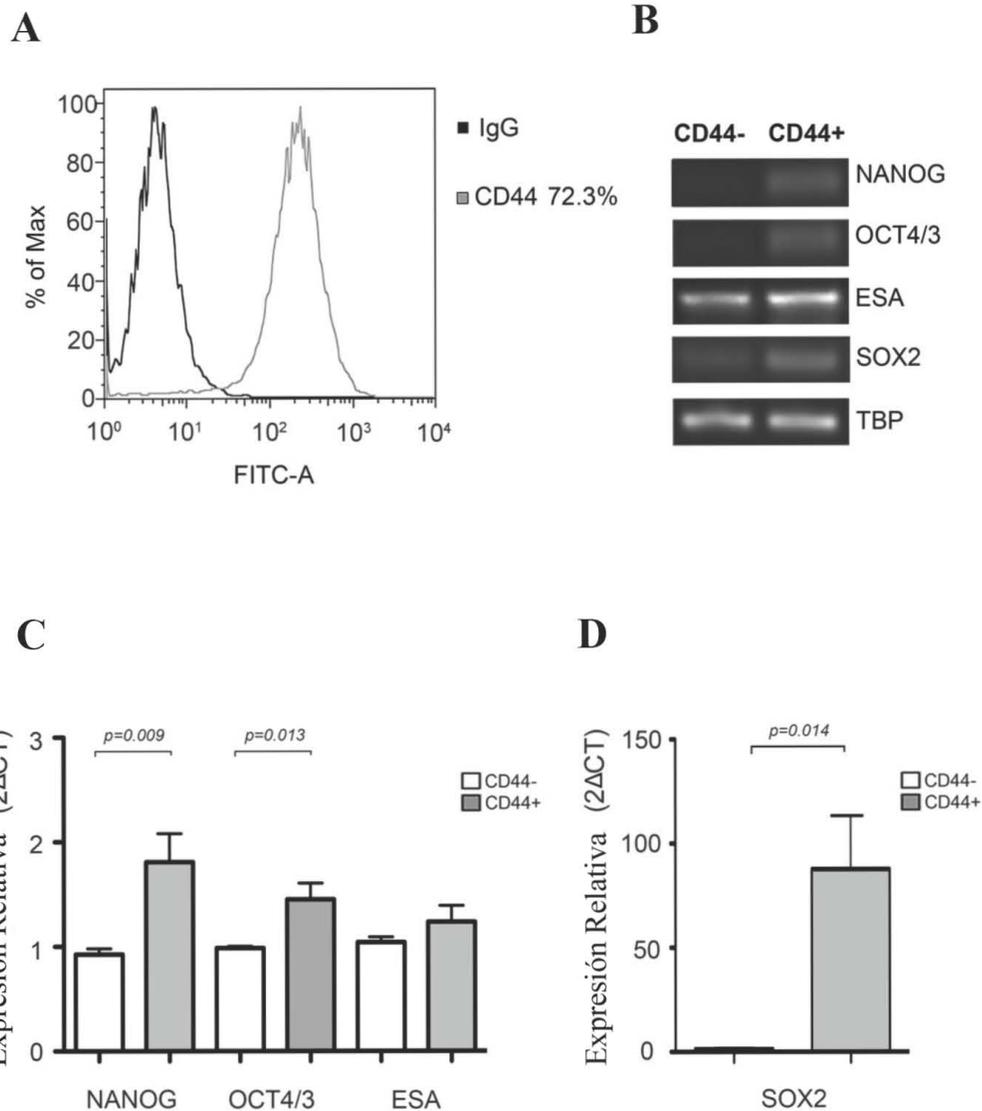
### **9.1 Aislamiento de CTTs de ovario**

#### **9.1.1 Aislamiento de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3**

Para determinar la presencia de CTTs de la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 empleamos el marcador de superficie celular CD44 para identificarlas y aislarlas mediante citometría de flujo, lo cual ha sido previamente reportado por varios grupos (Alvero et al., 2009; Bapat et al., 2005; Mor et al., 2011). Se determinó que entre el 65 y 72% de células de la población total de la línea células SKOV3 son positivas a CD44 (Figura 9A). Como parte de la caracterización fenotípica de estas células, también se determinó el porcentaje de células CD44/CD133 positivas en la línea SKOV3 de cáncer de ovario, ya que CD133 ha sido reportado como marcador de CTTs, sin embargo la población obtenida con ambos marcadores solo representó el 0.2% (Anexo 12.2 Figura Suplementaria 1A). Además, se trató de identificar la presencia de células positivas a MYD88 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA) mediante inmunofluorescencia, sin embargo, el marcador no se detectó en la línea total la línea celular SKOV3 (Anexo Figura suplementaria 1B), por lo cual se decidió emplear a la proteína CD44 para la identificación y aislamiento de las CTTs de la línea celular de ovario.

Para corroborar el fenotipo de células troncales en la población CD44+, se analizó la expresión relativa de los genes de troncalidad usando PCR semi-cuantitativa y qPCR. La subpoblación CD44+ de las células SKOV3 presentaron niveles de expresión significativamente altos de los genes Nanog, Oct4/3 y Sox2, al compararlas con las células de la subpoblación CD44- (Nanog con un valor de  $p=0.009$ , Oct4/3 con un valor de  $p=0.013$  y Sox2 con valor de  $p=0.014$ ) (Figura 9B, 9C y 9D), mientras que para el caso de ESA, solo se observó una tendencia de mayor expresión en células CD44+ al compararlas

con las células CD44<sup>-</sup> (Figura 9B y 9C). Por lo que las células CD44<sup>+</sup> detectadas en la línea celular SKOV3, presentaron características descritas de células troncales tumorales (CTTs).



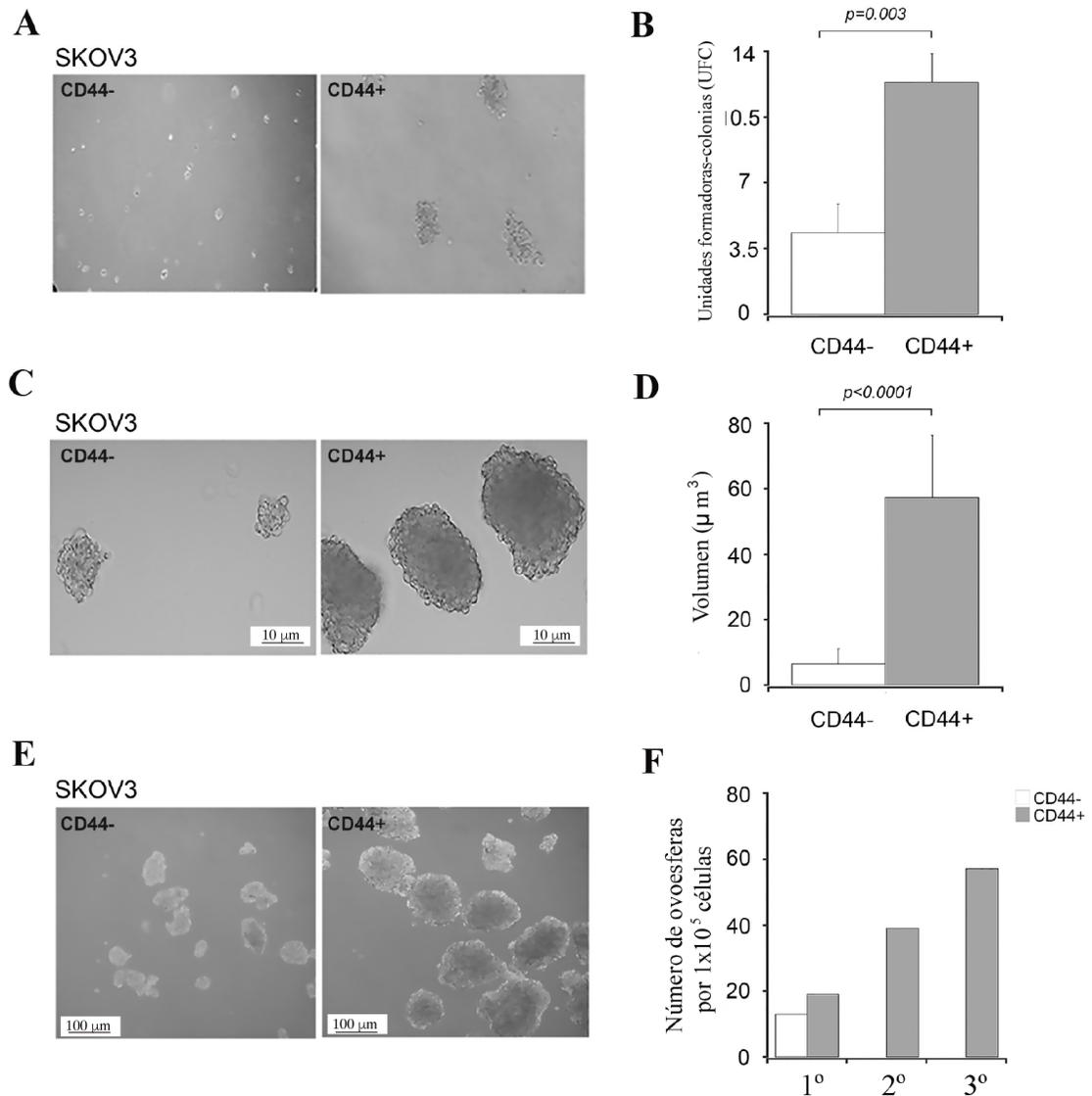
**Figura 9. Aislamiento y Caracterización de células CD44 positivas.** A) Porcentaje de células CD44<sup>+</sup> en la línea celular SKOV3. B) Niveles de expresión de genes de troncalidad en células CD44<sup>-</sup> y CD44<sup>+</sup> de la línea celular SKOV3, geles de agarosa representativos que indican la

expresión de los genes. C) Niveles de ARNm determinados por qPCR ( $2\Delta\text{CT}$ ) de tres genes del fenotipo troncal en células CD44- y CD44+ de la línea celular SKOV3. D) Niveles de ARNm determinados por qPCR ( $2\Delta\text{CT}$ ) del gen Sox2 en células CD44- y CD44+ de la línea celular SKOV3. La expresión constitutiva del gen TBP fue usada como control interno. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas biológicas. La prueba *t*-Student mostró diferencia significativa como es mostrada con el valor de *p*.

## 9.2 Caracterización de CTTs de ovario

### 9.2.1 Capacidad de clonogenicidad y formación de ooesferas de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3

Como parte de los ensayos para verificar el fenotipo de las células CTTs, se determinó su capacidad tumorigénica, mediante un ensayo de clonogenicidad para la subpoblación CD44+ usando como control negativo la subpoblación CD44-, ambas subpoblaciones derivadas de la línea SKOV3. Como se observó en la Figura 10, las células CD44+ formaron un mayor número de colonias al compararse con las células CD44- (Figura 10A). El conteo de colonias mostró diferencias estadísticamente significativa entre ambas subpoblaciones celulares (valor de  $p=0.003$ ) (Figura 10B). La capacidad de autorrenovación y de crecimiento autónomo fueron determinadas usando el ensayo de formación de ooesferas. La subpoblación de células CD44- SKOV3 formó ooesferas con tamaño aproximado de  $5 \mu\text{m}^3$ , mientras las células derivadas de la subpoblación CD44+ alcanzaron en promedio  $55 \mu\text{m}^3$  (Figura 10C) lo cual fue estadísticamente significativo (valor de  $p<0.0001$ ) (Figura 10D). Con este ensayo, se realizaron pases seriados, comúnmente usados como un marcador subrogado para el enriquecimiento de CTTs. Con este ensayo observamos que los esferoides derivados de las células CD44- formaron esferoides solo en el primer pase (1°), mientras las células CD44+ formaron ooesferas en los tres pases consecutivos (1°, 2°, 3°) (Figura 10E y 10F).

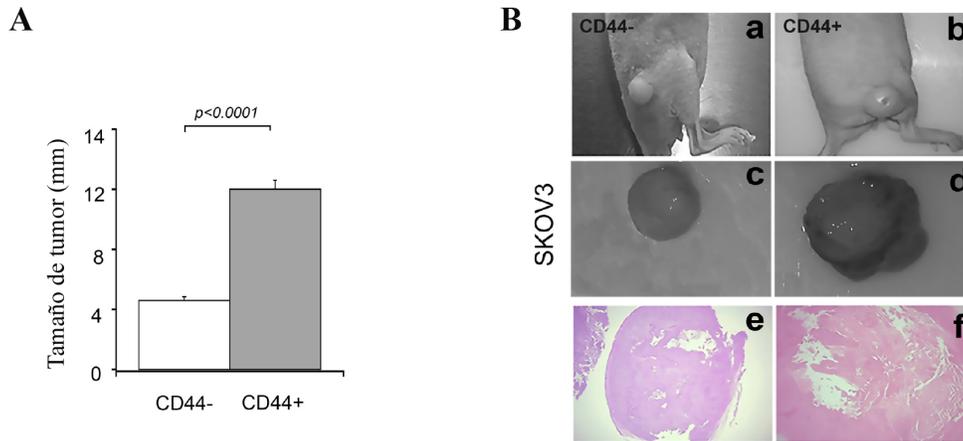


**Figura 10. Caracterización de células CD44- y CD44+ de células de la línea SKOV3.** A) Formación de colonias en agar suave. B) Representación gráfica del número promedio de colonias formadas por células CD44- y CD44+. C) Formación de oovesferas de células CD44- (panel izquierda) y CD44+ (panel derecha) de la línea celular SKOV3 después de 15 días de crecimiento. D) Las barras de la gráfica representan la diferencia en el crecimiento ( $\mu\text{m}^3$ ) de células CD44- comparadas con células CD44+. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas biológicas. La prueba *t*-Student mostró diferencia significativa como es mostrada con el

valor de  $p$ . E) Primer pase seriado de células de ovesferas CD44- (izquierda) y CD44+ (derecha) de la línea SKOV3. F) Representación del número de ovesferas en diferentes pases seriados de dos ensayos originados desde células CD44- y CD44+.

### **9.2.2 Evaluación de tumorigenicidad de células CD44 positivas de la línea celular SKOV3 en ratones desnudos**

Para determinar el potencial de tumorigenicidad en condiciones *in vivo* de las subpoblaciones de células CD44- y CD44+ de la línea SKOV3, se emplearon ratones desnudos inmunodeficientes hembras nu/nu, los cuales se inocularon con  $1 \times 10^5$  células de estas subpoblaciones celulares. Después de 15 días de la inoculación se observaron diferencias en el crecimiento de los tumores derivados de las dos subpoblaciones celulares (Figura 11). Los tumores de las células CD44- tuvieron un promedio de  $4.6 \pm 0.25$  mm de diámetro, mientras que los tumores de las células CD44+ presentaron un promedio de  $12 \pm 0.6$  mm de diámetro (diferencias estadísticamente significativas con valor de  $p < 0.0001$ ) (Figura 11A y 11B inciso a-d). Los tumores no presentaron zonas inflamatorias y la mayoría de las células formaron tejido tumoral, lo cual se pudo corroborar mediante una tinción de hematoxilina y eosina (Figura 11B inciso e-f).



**Figura 11. Caracterización funcional de células CD44- y CD44+ de células de la línea SKOV3.**  
 A) Diámetro (mm) de los tumores de células CD44- y CD44+ de línea celular SKOV3. El análisis estadístico, se realizó usando la prueba *t*-Student, la cual muestra diferencia estadísticamente significativa con el valor de  $p < 0.0001$ . B) Generación de tumores en ratones inmunodeficientes usando células SKOV3. Diferencia del crecimiento tumoral después de una inyección de  $1 \times 10^5$  células de la subpoblación CD44- (a) y de la subpoblación de células CD44+ (b). Tumores aislados de las subpoblaciones CD44- (c) y CD44+ (d). Secciones histológicas de los tumores, teñidas con eosina y hematoxilina, derivadas de la población de células CD44- (e) y células CD44+ (f).

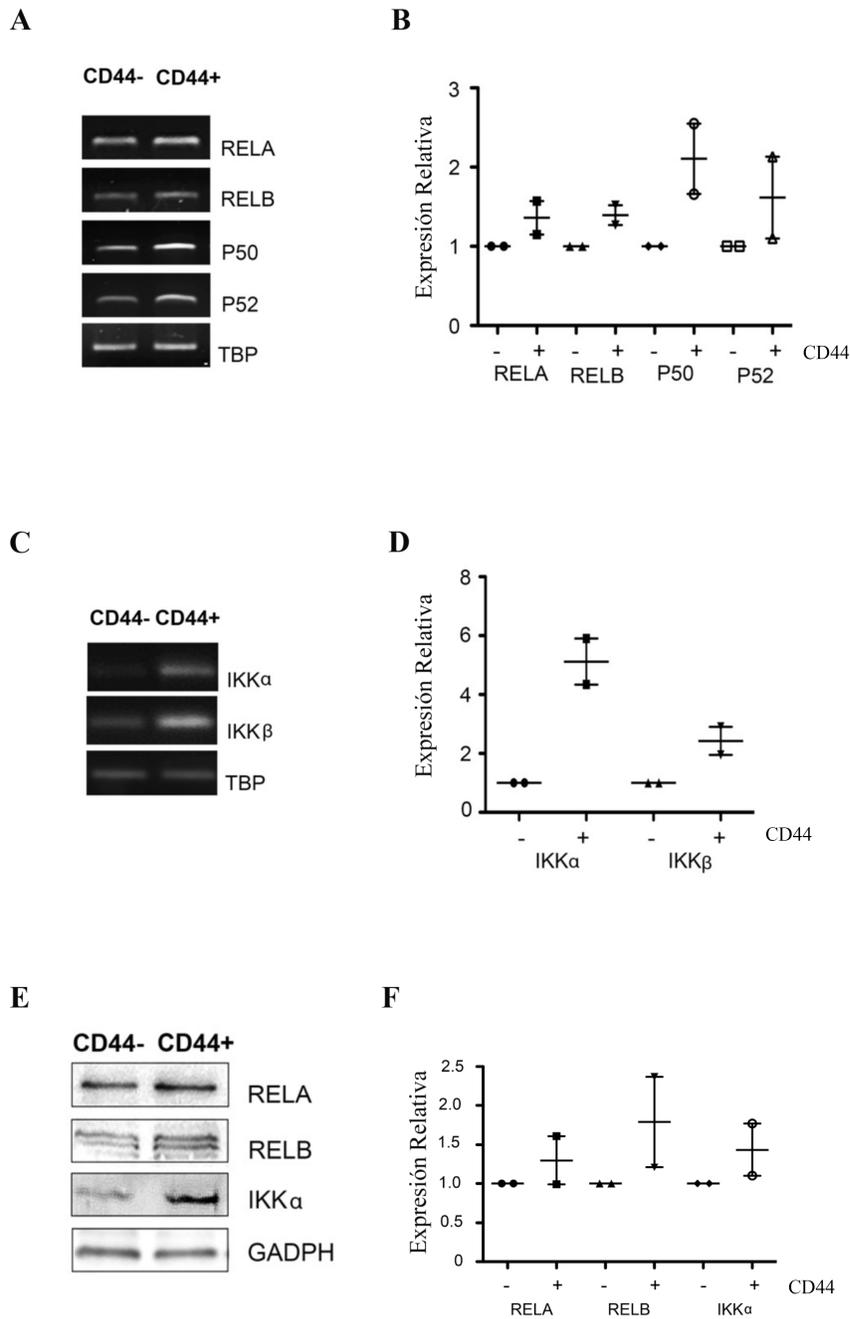
### 9.3 Participación de NF- $\kappa$ B en CTTs de ovario

#### 9.3.1 Expresión de subunidades de NF- $\kappa$ B en CTTs de la línea celular SKOV3

Con el objetivo de evaluar la presencia e importancia de NF- $\kappa$ B en las CTTs de ovario, se determinó la expresión del ARN mensajero de varios miembros de la familia de NF- $\kappa$ B en células troncales y no troncales de la línea SKOV3 por PCR semicuantitativa (Figura 12A y 12B). Los resultados mostraron un incremento en la expresión de ARNm de RelA, RelB, p50, p52 y los reguladores cascada arriba, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  en las células CD44+ al compararse con la población CD44- de la línea celular SKOV3 (Figura 12C y 12D).

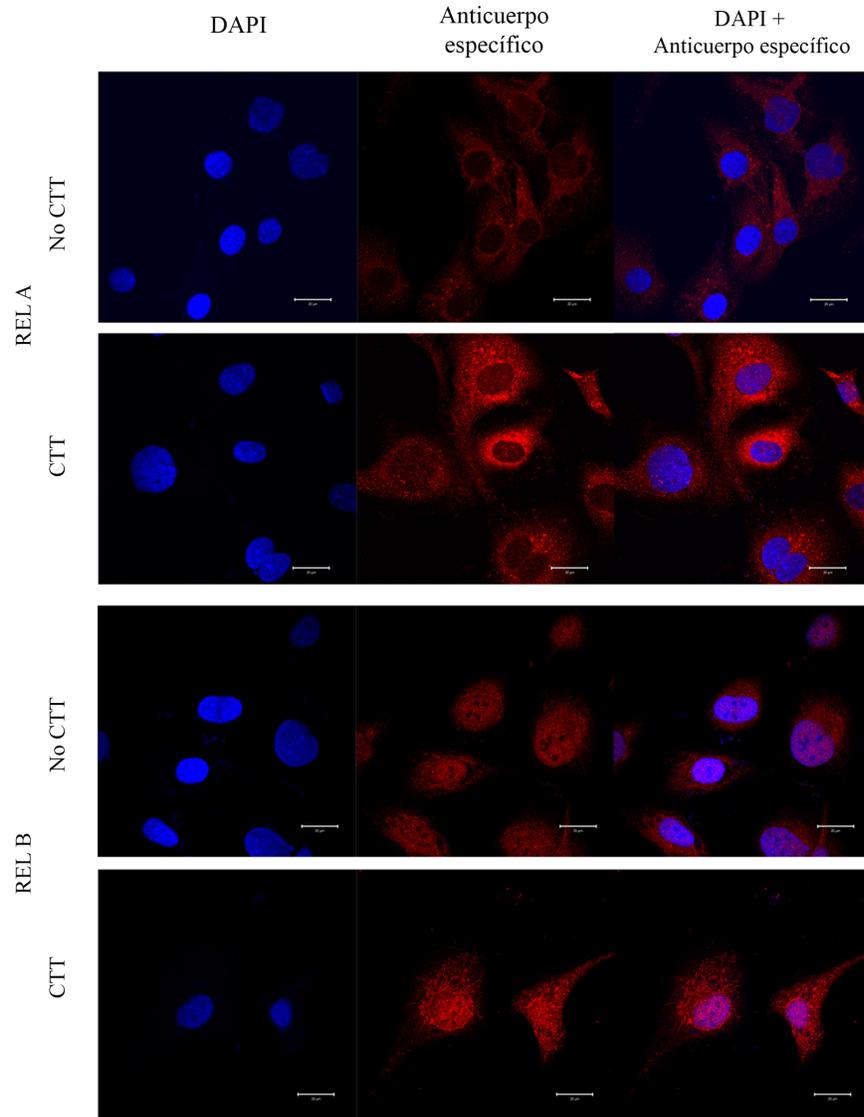
Asimismo, se analizaron los niveles de proteína por Western blot, encontrándose un

incremento en los niveles de las proteínas RelA, RelB, e IKK $\alpha$  en las células de la subpoblación CD44+ comparados con los niveles en la subpoblación CD44- (Figura 12E y 12F). Los niveles de RelA y RelB también se analizaron por inmunofluorescencia, observándose una mayor intensidad de fluorescencia para estas proteínas en la subpoblación de células CD44+ a diferencia de la subpoblación CD44-, después del análisis de micrografías (Figura 13). El resultado de la evaluación de las proteínas RelA y RelB en inmunofluorescencia fue consistente con los resultados encontrados por Western blot.



**Figura 12. Análisis de la expresión de RelA, RelB, IKK $\alpha$ , p50 y p52 en células no CTTs y CTTs de la línea SKOV3.** A) Niveles de ARNm de genes RelA, RelB, p50 y p52 en células no CTTs y CTTs de la línea celular SKOV3. B) Expresión relativa de los genes RelA, RelB, IKK $\alpha$ , p50 y p52 resultados de densitometría en no CTTs y CTTs en la línea celular SKOV3. C) Niveles de ARNm de IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  en no CTTs y CTTs en la línea celular SKOV3. D) Expresión

relativa de los niveles de ARNm de IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  en no CTTs y CTTs en la línea celular SKOV3, resultados de densitometría. Geles representativos indican la expresión de todos los genes. Sólo un ensayo es mostrado como representativo de dos réplicas experimentales. TBP fue usado como gen constitutivo para los ensayos de RT-PCR. E) Western blots de las proteínas RelA, RelB, IKK $\alpha$  en no CTTs y CTTs de la línea celular SKOV3. F) Expresión relativa de las proteínas RelA, RelB, IKK $\alpha$  en no CTTs y CTTs de la línea celular SKOV3. La proteína GAPDH fue usado como control de carga en los Western blots. Geles representativos indican la expresión de todas las proteínas. Sólo un ensayo es mostrado como representativo de dos réplicas experimentales. Todos los ensayos se realizaron con dos réplicas biológicas.



**Figura 13. Inmunodetección de las proteínas RelA y RelB de la familia de NF- $\kappa$ B.** Inmunofluorescencia de las proteínas RelA y RelB en las poblaciones CTTs y no CTTs de la línea celular SKOV3. Imágenes primera columna, tinción con DAPI (núcleos); segunda columna Anticuerpo específico; tercera columna DAPI y Anticuerpos específicos.

### **9.3.2 Participación de la vía de canónica de NF-kB, en el fenotipo de CTTs de la línea celular SKOV3**

Debido a la regulación de las moléculas de la vía de NF-kB en las CTTs de varios tipos de tumor y dado que encontramos la presencia de varios miembros de esta familia en las CTTs de ovario, el siguiente objetivo fue analizar la participación de la vía de NF-kB en el fenotipo troncal. Con este propósito, se usó la línea celular SKOV3-IkB $\alpha$ DN, la cual expresa la proteína mutante IkB $\alpha$  dominante negativa, y como control la línea con el vector vacío SKOV3-PLXSN. Se determinó, que las células SKOV3-IkB $\alpha$ DN presentaron niveles elevados de la proteína IkB $\alpha$  con una relativa baja proporción de la forma fosforilada (p-IkB $\alpha$ ) (Figura 14A). De acuerdo con estos resultados, la vía canónica de NF-kB, fue exitosamente inhibida lo cual se demostró mediante el ensayo de gen reportero, el cual se encuentra bajo el control de sitios de unión para NF-kB después de la exposición a TNF $\alpha$ . Encontramos una diferencia estadísticamente significativa (con un valor de  $p < 0.001$ ) entre las condiciones con y sin exposición a TNF $\alpha$  entre las células SKOV3-IkB $\alpha$ DN y las células control (Figura 14B). Estos ensayos se empleó TNF $\alpha$ , debido a que es una citocina que se ha reportado regula la activación de NF-kB.

De manera interesante, la inhibición de la vía canónica de NF-kB redujo el porcentaje de células CD44 $^{+}$  de 65.3% a 22.7% como se observó mediante citometría de flujo (Figura 14C).

Como parte de estos resultados, se determinó el efecto de la inhibición de la vía canónica de NF-kB en la capacidad de formación de ooesferas en la línea celular SKOV3-IkB $\alpha$ DN. Se observó que las células SKOV3-IkB $\alpha$ DN formaron un número significativamente menor de ooesferas que la línea control SKOV3-PLXSN (valor de  $p < 0.01$ ), después de 8 días de crecimiento en cultivo. Además el diámetro de las ooesferas derivadas de la línea

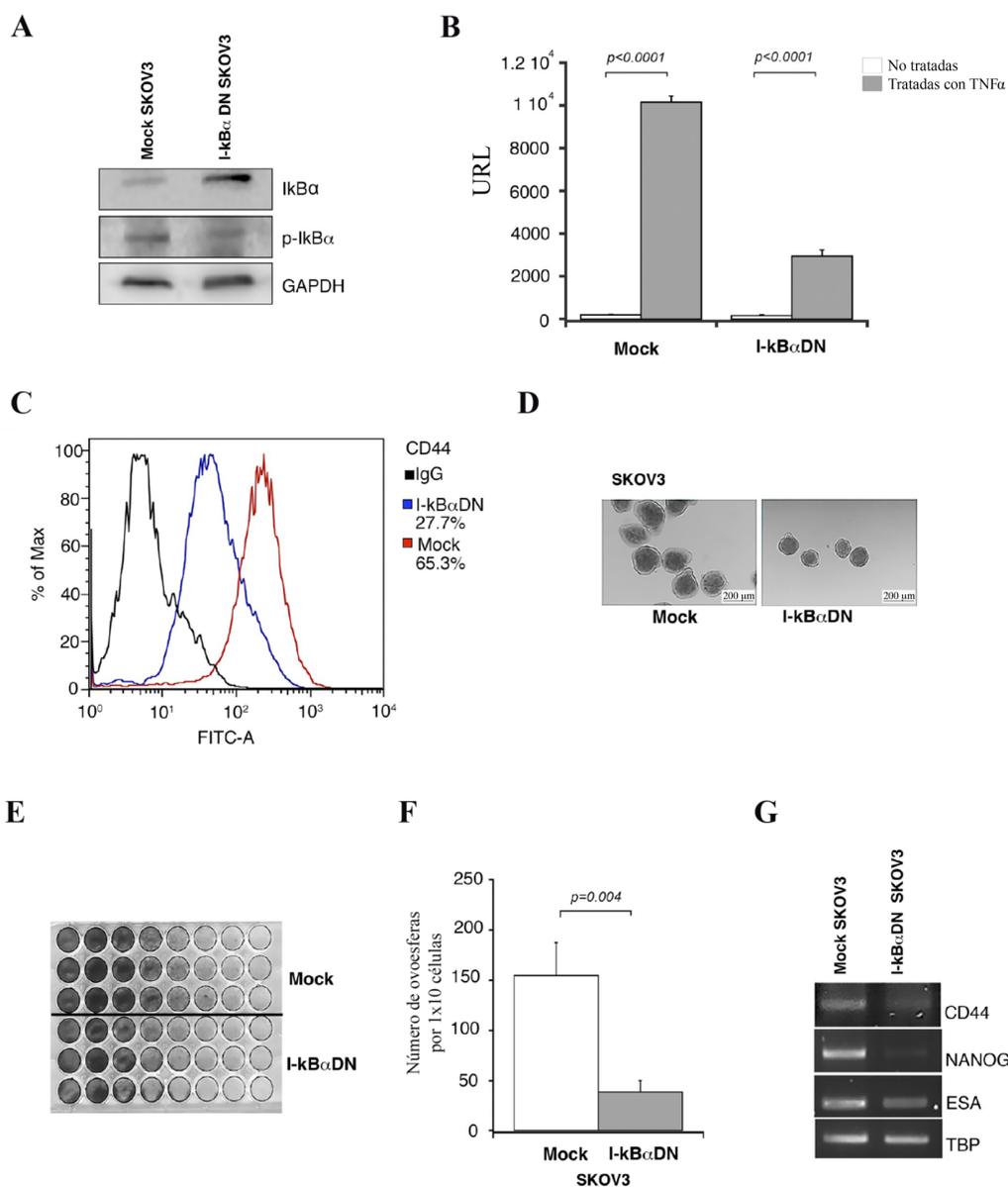
con inhibición de NF- $\kappa$ B fue menor al compararlas con la línea control (Figura 14D y 14F). Asimismo, en los experimentos de dilución seriada, se observó una disminución en el número de colonias formadas por las células de la línea SKOV3-I $\kappa$ B $\alpha$ DN (Figura 14E).

Además, se encontró que la inhibición de la vía canónica de NF- $\kappa$ B redujo la expresión de del gen CD44, así como de los genes de troncalidad Nanog y ESA (Figura 14G). También, se observó, una disminución en la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la proteína RelA en las células CD44<sup>+</sup> de la línea SKOV3-I $\kappa$ B $\alpha$ DN al comparar con las células CD44<sup>+</sup> derivadas de las células SKOV3-PLXSN (Anexo 12.2 Figura Suplementaria 2A y 2B).

Para profundizar en el efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B en las células de la línea celular de ovario, se aislaron células CD44<sup>+</sup> de la línea SKOV3-I $\kappa$ B $\alpha$ DN para determinar su capacidad de clonogenicidad. En estos experimentos se encontró una disminución en la formación de colonias en las células CD44<sup>+</sup> que expresan I $\kappa$ B $\alpha$ DN al compararlas con las líneas SKOV3 sin transfección y SKOV3-PLXSN. Por otra parte, estas líneas celulares no presentaron diferencias en su capacidad de formación de ooesferas, lo cual sugirió que la inhibición de la vía canónica de NF- $\kappa$ B, podría disminuir el número de células troncales en la línea SKOV3-I $\kappa$ B $\alpha$ DN, pero no la habilidad de estas células para generar progenie (Figura 15A y 15B).

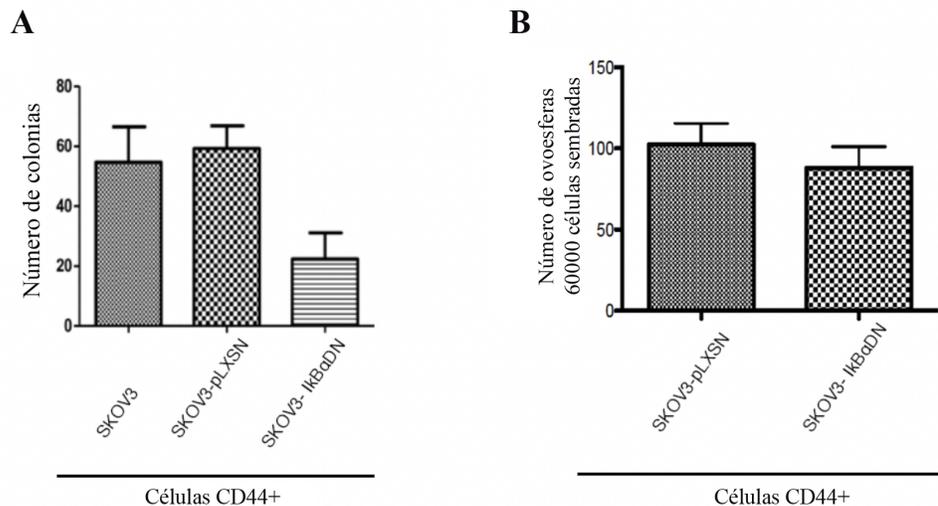
Finalmente, para determinar el potencial tumorigénico de la células SKOV3-I $\kappa$ B $\alpha$ DN comparadas con las células SKOV3-PLXSN se realizó una colaboración con la Dra. Cecilia Zampedri del INMEGEN. En la cual se probó la formación de tumores inyectando 3 diluciones diferentes de estas líneas celulares en el saco vitelino del pez cebra; las diluciones se observan en la tabla de la figura 16. Después de 3 días posteriores a la inyección (Dpi) se observó que los peces que fueron inyectados con las células SKOV3-PLXSN formaron una mayor cantidad de tumores la cual fue más evidente con la dilución

de 200 células respecto a los peces con las células SKOV3-IkBaDN (Figura 16 B). Nosotros sugerimos que esto se debe a que la línea SKOV3-IkBaDN presenta un menor número de células troncales tumorales (CD44+) cuando la comparamos con la línea celular SKOV3-PLXSN. Esto concuerda con los resultados previos en los cuales se observó que las células SKOV3-IkBaDN presentaron disminución en su capacidad clonogenica y de formación de esferoides.



**Figura 14. Papel de la vía canónica de NF- $\kappa$ B en células de la línea SKOV3.** A) Expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  y p-I $\kappa$ B $\alpha$  en la línea celular estable de SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y en la línea celular control Mock (PLXSN). GAPDH fue usado como control de carga para los Western blots. B) La actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B medida por el ensayo del gen reportero luciferasa con y sin tratamiento con 10ng/ml de TNF $\alpha$  en la línea celular estable SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y en la línea celular control Mock (PLXSN). Unidades relativas de luminiscencia (URL). Las barras de error representan la

media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. C) El porcentaje de células CD44<sup>+</sup> en las líneas celulares estables SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y en la línea celular control Mock (PLXSN) fueron determinadas por citometría de flujo. El histograma muestra el porcentaje de células CD44<sup>+</sup> para el control de isotipo IgG (negro), I-kB $\alpha$ DN (azul), y Mock (rojo). D) Formación de ooesferas para las clonas de las líneas celulares SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y la línea celular control Mock (PLXSN), se muestra la imagen representativa del crecimiento de esferoides para cada línea celular, después de 20 días de crecimiento en cultivo. E) Ensayos de dilución de formación de clonas de las líneas celulares SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y la línea celular control Mock (PLXSN). F) Formación de ooesferas de las líneas SKOV3 transfectadas con I-kB $\alpha$ DN y Mock, con 8 días de crecimiento. Para cada ensayo se sembraron  $1 \times 10^4$  células. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. G) Niveles de expresión de ARNm de los genes de troncalidad CD44 y ESA en las líneas I-kB $\alpha$ DN y Mock; imagen representativa de tres ensayos independientes usando RT-PCR. TBP fue usado como control de carga para la expresión de ARNm de los genes. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba *t*-Student, las diferencias estadísticas son mostradas con el valor de *p*.



**Figura 15. Papel de la vía de señalización canónica de NF-kB en CTTs de la línea SKOV3, ensayos de clonogenicidad y formación de ooesferas.** A) Número de colonias formadas por células CD44<sup>+</sup> derivadas de líneas celulares estables SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y CD44<sup>+</sup> de la línea celular control Mock (PLXSN). B) Número de ooesferas formadas por 60000 células sembradas

CD44+ derivadas de líneas celulares estables SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y CD44+ de la línea celular control Mock (PLXSN). Las barras de error representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres replicas biológicas independientes.

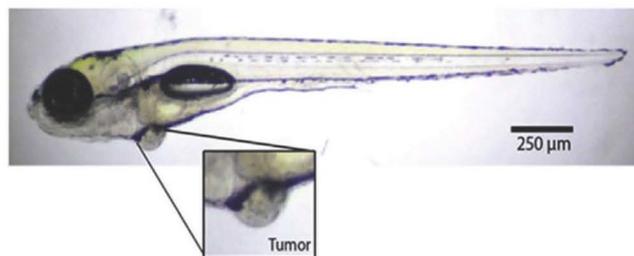
**A**

Tratamiento	Dilución (No. de células)	Tumor
SKOV3-pLXSN	50	1/3 = 8%
	100	3/30 = 10%
	200	7/29 = 24%
SKOV3-IK $\beta$ DN	50	0/15 = 0%
	100	1/25 = 4%
	200	1/21 = 5%

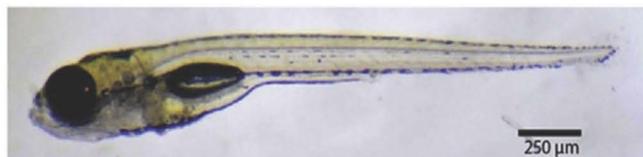
Valor de  $p = 0.0188$

**B**

3 Dpi Embrión de pez cebra  
xenotrasplantes con 200 células  
SKOV3-pLXSN



3 Dpi Embrión de pez cebra  
xenotrasplantes con 200 células  
SKOV3-IK $\beta$ DN

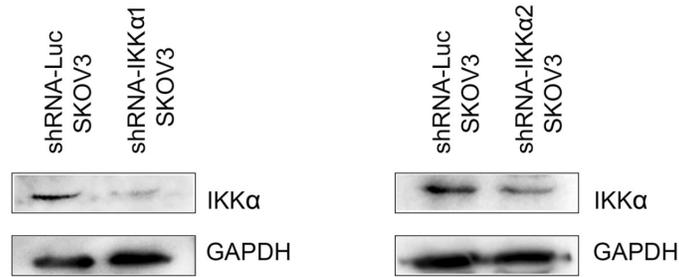
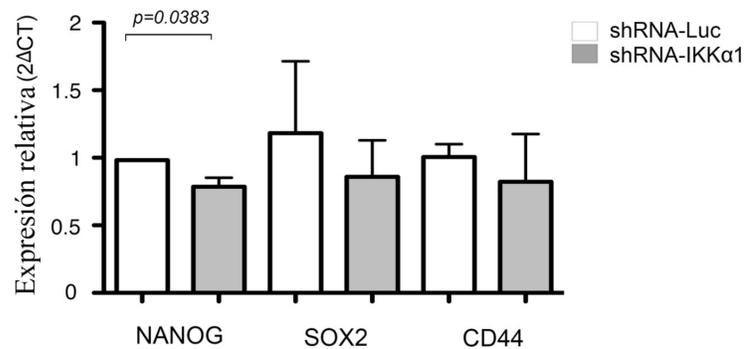


**Figura 16. Formación de tumores en embriones de Pez Cebra.** A) Diluciones celulares de células CD44+ derivadas de líneas celulares estables SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y CD44+ de la línea celular control Mock (PLXSN) inoculadas en Pez Cebra, así como el porcentaje de formación de tumores. El valor de  $p$  indica diferencias significativas entre grupos celulares obtenidos mediante el

ensayo de ELDA. B) Fotografía representativa de formación de tumores en Pez Cebra por inoculación de células CD44+ derivadas de líneas celulares estables SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y CD44+ de la línea celular control Mock (PLXSN).

### **9.3.3 Participación de IKK $\alpha$ en el fenotipo de CTTs de la línea celular SKOV3**

Teniendo en cuenta que la cinasa IKK $\alpha$  participa en la activación cascada arriba en la vía de activación canónica y no canónica de NF-kB, además de tener otras funciones (S. C. Sun, 2011) y que se determinó que las CTTs presentan altos niveles de expresión de esta proteína, se determinó evaluar su función en esta subpoblación celular, para lo cual disminuimos su expresión usando dos shRNAs. Los resultados de esta inhibición mostraron que ambos shRNAs inhiben la expresión de la cinasa IKK $\alpha$ , lo cual fue observado por análisis de Western blot (Figura 17A). La expresión disminuida de IKK $\alpha$  produjo una reducción de la expresión del gen de troncalidad Nanog en las células SKOV3 con diferencia estadísticamente significativa entre la población celular con el shRNA1 contra IKK $\alpha$  (shRNA-IKK $\alpha$ 1) y la población control (shRNA-Luc) (valor de  $p=0.0383$ ). El análisis de los genes Sox2 y CD44 no mostró diferencia significativa aunque se observó una tendencia a disminuir su expresión en las células transfectadas con shRNA-IKK $\alpha$ 1 comparadas con las células control (Figura 17B).

**A****B**

**Figura 17. Papel de IKKα en CTTs de la línea SKOV3.** A) Niveles de expresión de la proteína IKKα en shRNA- IKKα1, shRNA- IKKα2, y células control shRNA-Luc. GAPDH fue usado como control de carga para el Western blot. B) Los niveles ARNm fueron determinados por qPCR (2<sup>-ΔCT</sup>) de dos genes de troncalidad Nanog, Sox2 y CD44 en células SKOV3 transfectadas con shRNA-IKKα2 y el control shRNA-Luc. La expresión del gen constitutivo TBP fue usada como control de carga. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas biológicas independientes. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba *t*-Student, las diferencias estadísticas son mostradas con el valor de *p*.

## **X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

El concepto de una subpoblación de células responsable del mantenimiento de las neoplasias surgió hace 50 años, actualmente hay evidencia concluyente de que las CTTs son las responsables de la iniciación, progresión, metástasis, así como resistencia a tratamientos y recurrencia del cáncer. En el cáncer de ovario, existe evidencia de la presencia de CTTs, tanto en muestras de pacientes, como en líneas celulares. En este trabajo se aislaron e identificaron las CTTs de la línea celular de ovario SKOV3, a través del marcador de membrana CD44, esto nos permitió tener una población enriquecida de CTTs, no se incluyó el marcador CD133, debido a que solo un porcentaje muy limitado de células se pudo aislar a través de este. Debido a esto fue importante confirmar el fenotipo troncal de las células CD44 positivas derivadas de la línea SKOV3, para lo cual inicialmente se analizó la expresión de genes de troncalidad particularmente la expresión de Nanog, Oct4/3 y ESA, estos tres genes se han descrito previamente en CTTs de muchos tipos de tumores y se relacionan con la proliferación e inhibición de la apoptosis. Observamos que hay una tendencia a mayor expresión de estos tres genes en las células CD44+ a diferencia de las CD44-, sin embargo claramente encontramos que el factor Sox2, destaca en la expresión de las células CD44+ al compararlas con las CD44-. De manera interesante, se ha descrito que este gen funciona como un oncogen en el cáncer de ovario epitelial (Weina & Utikal, 2014), esto podría indicar particularmente que Sox2, tiene un papel importante en las características de proliferación y potencial tumorigénico de las CTTs que aislamos de la línea celular SKOV3 debido a su origen epitelial. Más aún se ha reportado que la inhibición de Sox2, disminuye la proliferación y migración celular de CTTs de otras líneas celulares de cáncer de ovario, además la ausencia de este gen impide

la formación de esferoides (Wen, Hou, Huang, Cai, & Wang, 2017). Por lo que Sox2 podría ser un buen candidato que nos permitá identificar también la presencia de CTTs en otras líneas celulares de cáncer de ovario de origen epitelial. El fenotipo troncal de las CD44+, también se confirmó mediante la caracterización funcional de su potencial clonogénico, ensayo de formación de estructuras independientes de anclaje, donde es clara la diferencia entre las células CD44 negativas (CD44-), las cuales no concretan su crecimiento y proliferación bajo estas condiciones de cultivo. El ensayo de pases seriados de la formación de esferoides corrobora la capacidad de autorrenovación por parte de las células CD44+ en condiciones *in vitro*, lo cual fue sustentado también por la formación de tumores después de trasplantar células CD44+ en ratones inmunodeficientes.

Una de las características de las CTTs es que poseen rutas de señalización activas, que les permiten estimular la carcinogénesis. Como previamente hemos descrito, se ha reportado que NF-kB es una de las vías de transducción más importantes, activadas en las células troncales tumorales de diversos tumores (Merchant & Matsui, 2010; Pannuti et al., 2010; Schwitalla et al., 2013; L. Sun et al., 2013; Takahashi-Yanaga & Kahn, 2010). Después de corroborar el fenotipo troncal de las células CD44+ derivadas de la línea celular de cáncer de ovario SKOV3, medimos los niveles de varias proteínas correspondientes a esta cascada de señalización de la vía canónica de NF-kB. La población CD44+ presentó altos niveles de la proteína RelA y p50. Estos resultados fueron interesantes debido a que no se empleo ningún estímulo que pudiera activar a la vía de NF-kB en esta subpoblación celular. A este respecto, se ha reportado que la vía de NF-kB canónica esta constitutivamente activada en las células troncales tumorales de ovario desde las líneas celulares primarias (Alvero et al., 2009; Chefetz et al., 2013; Leizer et al., 2011). Por lo que consideramos que pudiera estar activa esta vía en las células CD44+ de la línea celular SKOV3. Por lo cual se decidió

modular la vía canónica de NF- $\kappa$ B y determinar el efecto en la población CTTs de SKOV3. La inhibición estable de la vía canónica a través del dominante negativo I $\kappa$ B $\alpha$ , redujo la población de CTTs (CD44+) en la línea celular SKOV3. Además la inhibición de la vía canónica NF- $\kappa$ B impactó directamente en la formación de ovesferas y el establecimiento de colonias en bajas diluciones celulares. Por lo que consideramos que de la población total de la línea SKOV3 se afectó directamente a las células CTTs (CD44+), dado que son las células que previamente se comprobó tienen el potencial clonogénico y de formación de estructuras libres de anclaje. Con estos resultado pudimos establecer una relación entre la actividad de NF- $\kappa$ B y la expresión de CTTs (CD44+) en la línea celular SKOV3. Recientemente, se ha reportado que el gen CD44 alberga un elemento activo en cis de NF- $\kappa$ B, presente en células troncales tumorales de mama (Smith & Cai, 2012). En concordancia con esto, nosotros observamos que la disminución en la actividad de la vía canónica de NF- $\kappa$ B tiene como consecuencia la disminución de la expresión del gen CD44. Sin embargo, es necesario determinar cual es el mecanismo por el cual disminuye la expresión de CD44 ante la inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B.

Interesantemente también al inhibir la vía canónica NF- $\kappa$ B disminuye la expresión de genes como Nanog, involucrados en la autorrenovación y proliferación de CTTs de ovario. Existen trabajos que concuerdan con nuestros resultados, un estudio previo, reportó que la inhibición de NF- $\kappa$ B reduce la expresión de Nanog en CTTs de la línea celular de cáncer de pulmón A549 (Zakaria et al., 2018). Otro estudio, mostró que la activación del dímero RelA/p50 incrementa la actividad del promotor del gen Nanog, en CTTs de mama (M. Liu et al., 2010; Shostak & Chariot, 2011), por lo que lo hace un candidato como gen blanco de NF- $\kappa$ B.

Para determinar el efecto de la inhibición de la actividad de NF-kB específicamente en la población CTTs de la línea SKOV3, se aislaron las células CD44+ de la línea con inhibición de la vía de NF-kB (SKOV3-IkBaDN) y las células CD44+ de la línea con el plásmido control con el objetivo de determinar su capacidad de clonogenicidad. Se comprobó que la disminución de la actividad de la vía de NF-kB si afecta directamente a las CTTs (CD44+) de la línea celular de ovario (SKOV3), ya que se observó disminución de la formación de colonias, en la población de células CD44+.

Sin embargo, el efecto solo se observó en la formación de colonias, no así para el caso de la formación de ooesferas, lo que sugiere que la habilidad de autorrenovación no es totalmente afectada al inhibir la vía canónica de NF-kB, por lo que el efecto que observamos con la disminución de formación de ooesferas cuando cultivamos la línea total SKOV3-IkBaDN, podría deberse principalmente a la disminución del número de células CTTs (CD44+), más que por la disminución de la expresión de CD44, como inicialmente consideramos, o bien a que existen otras vías de señalización que al no ser afectadas tratan de rescatar algunas de las habilidades de las CTTs.

En contraste a lo observado para la formación de ooesferas, las células CD44+ con disminución de la actividad de la vía canónica de NF-kB (SKOV3-IkBaDN) presentaron alteración en su potencial tumorigénico, ya que al ser inyectadas en el modelo *in vivo* de pez cebra, formaron un número limitado de tumores, al compararlas con células CD44+ derivadas del control sin alteración de la vía de NF-kB. Cabe destacar que al inyectar un número de 50 hasta 200 células fueron incapaces de formar el mismo número de tumores que el control. Este resultado concuerda con lo observado anteriormente, si hay reducción de la actividad de la vía canónica de NF-kB, disminuye el número de CTTs en la línea celular de cáncer de ovario, lo que impacta en la formación y mantenimiento del tumor.

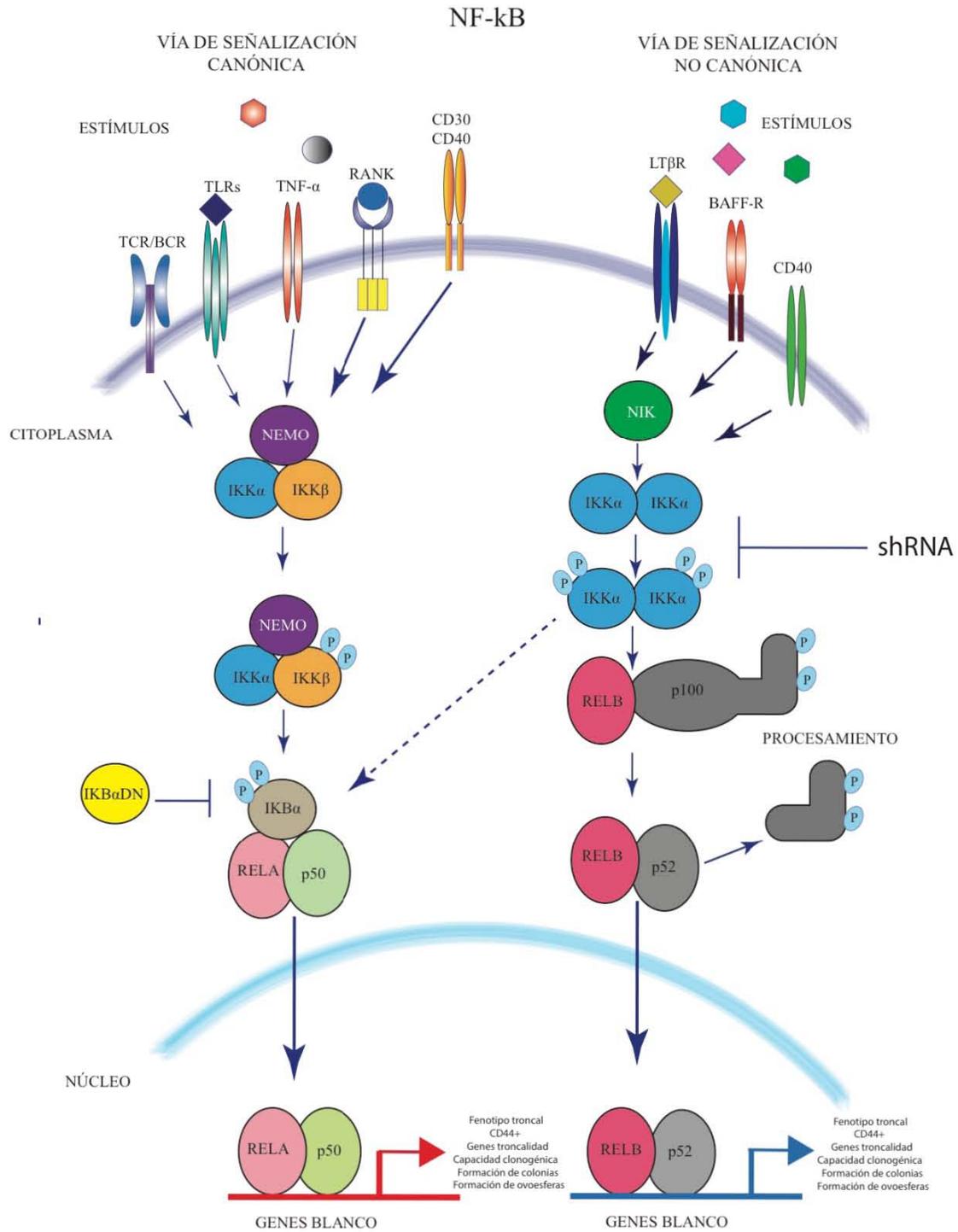
Interesantemente estos resultados concuerdan con un reporte en tumores dependientes de Her-2 en cáncer de mama, donde al suprimir la vía de NF- $\kappa$ B disminuye dramáticamente la proporción de células positivas a CD44, lo cual impacta en la expansión de estas células (M. Liu et al., 2010).

Como parte de los resultados que observamos, fue la presencia de altos niveles de la proteína RelB en la subpoblación de células troncales de ovario (CD44+), lo cual indica que la vía de activación no canónica de NF- $\kappa$ B, podría estar involucrada en el fenotipo troncal de células de ovario, como se ha descrito en otros tumores como en glioma mesenquimal en donde se describió a RelB como un gen promotor del crecimiento tumoral e invasión (Lee et al., 2013).

Estos resultados fueron respaldados al observar una diferencia en los niveles de expresión de la proteína IKK $\alpha$  en la línea celular SKOV3, la cual es una cinasa componente de ambas vías de señalización de NF- $\kappa$ B, pero esencial en la vía de activación no canónica, aunque sin dejar de lado sus funciones asociadas a la cromatina, previamente descritas.

Esta cinasa fue encontrada mayormente expresada en células troncales tumorales (CD44+) y su inhibición con shRNAs, disminuyó la expresión de los factores de transcripción Nanog, CD44 y Sox2. Existen reportes que indican la participación de IKK $\alpha$  en la biología de células troncales de ESCs dentro del neuroectodermo y células troncales de cáncer de mama (Luningschror et al., 2012; L. Sun et al., 2013). En un modelo de cáncer de mama Her-2, se reportó que la cinasa IKK $\alpha$ , fosforila a p27 (proteína involucrada en la transición de G1-S del ciclo celular), conduciendo su salida del núcleo, lo que consecuentemente promueve la proliferación de CTTs y su expansión (W. Zhang et al., 2013). Por lo que resulta importante indagar más acerca de la función de esta proteína en las CTTs de ovario.

Nuestros resultados sugieren que ambas vías de señalización de NF- $\kappa$ B están involucradas en las células troncales tumorales de ovario posiblemente a través de la regulación de genes que dirigen el fenotipo troncal (Figura 18), a pesar de que se evaluó mas detalladamente la vía canónica de NF- $\kappa$ B, así como la proteína IKK $\alpha$ . Por lo que trabajos futuros son necesarios para determinar que moléculas específicas de las vías de NF- $\kappa$ B, podrían funcionar como blancos terapéuticos para evitar el crecimiento de los tumores a nivel de las células troncales tumorales. Esto podría tener un gran impacto en el estudio y caracterización de la población de CTTs de muestras de pacientes con cáncer de ovario, con el fin de mejorar el diagnóstico y el desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad, para así mejorar la esperanza de vida de las pacientes.



**Figura 18.** Un modelo del efecto de la proteína mutante de I $\kappa$ B $\alpha$ , en la activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B y de dos shRNA contra la cinasa IKK $\alpha$  en dos puntos de la vía de activación no canónica de NF- $\kappa$ B en el fenotipo de las células troncales tumorales de ovario.

## XI. REFERENCIAS

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., . . . Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, *158*(5), 1110-1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013
- Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2007). IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis. *Cell*, *129*(1), 25-26. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.029
- Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, *3*(7), 502-516. doi: 10.1038/nrc1123
- Ahmed, N., Abubaker, K., Findlay, J., & Quinn, M. (2013). Cancerous ovarian stem cells: obscure targets for therapy but relevant to chemoresistance. *J Cell Biochem*, *114*(1), 21-34. doi: 10.1002/jcb.24317
- 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 U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
- Alvero, A. B., Chen, R., Fu, H. H., Montagna, M., Schwartz, P. E., Rutherford, T., . . . Mor, G. (2009). Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, *8*(1), 158-166. doi: 10.4161/cc.8.1.7533
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., & Baldwin, A. S. (2003). A nucleosomal function for I kappa B kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature*, *423*(6940), 659-663. doi: 10.1038/nature01648
- Apostolou, P., Toloudi, M., Chatziioannou, M., Ioannou, E., & Papisotiriou, I. (2012). Cancer stem cells stemness transcription factors expression correlates with breast cancer disease stage. *Curr Stem Cell Res Ther*, *7*(6), 415-419.
- Ayub, T. H., Keyver-Paik, M. D., Debal, M., Rostamzadeh, B., Thiesler, T., Schroder, L., . . . Kubler, K. (2015). Accumulation of ALDH1-positive cells after neoadjuvant chemotherapy predicts treatment resistance and prognosticates poor outcome in ovarian cancer. *Oncotarget*, *6*(18), 16437-16448. doi: 10.18632/oncotarget.4103
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, *14*, 649-683. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.649
- Bapat, S. A., Mali, A. M., Koppikar, C. B., & Kurrey, N. K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, *65*(8), 3025-3029. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3931
- Bast, R. C., Jr., Hennessy, B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, *9*(6), 415-428. doi: 10.1038/nrc2644
- Birnie, R., Bryce, S. D., Roome, C., Dussupt, V., Droop, A., Lang, S. H., . . . Collins, A. T. (2008). Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol*, *9*(5), R83. doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r83
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, *25*(6), 280-288. doi: 10.1016/j.it.2004.03.008
- Bonneau, C., Rouzier, R., Geyl, C., Cortez, A., Castela, M., Lis, R., . . . Touboul, C. (2015). Predictive markers of chemoresistance in advanced stages epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, *136*(1), 112-120. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.10.024
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, *3*(7), 730-737.

- Bourguignon, L. Y., Peyrolier, K., Xia, W., & Gilad, E. (2008). Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem*, *283*(25), 17635-17651. doi: 10.1074/jbc.M800109200
- Buick, R. N., & MacKillop, W. J. (1981). Measurement of self-renewal in culture of clonogenic cells from human ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, *44*(3), 349-355.
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., & Upadhyaya, N. B. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, *2*, 20. doi: 10.1186/1477-7827-2-20
- Cao, Y., Luo, J. L., & Karin, M. (2007). I $\kappa$ B kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(40), 15852-15857. doi: 10.1073/pnas.0706728104
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, *331*(6024), 1559-1564. doi: 10.1126/science.1203543
- Chefetz, I., Alvero, A. B., Holmberg, J. C., Lebowitz, N., Craveiro, V., Yang-Hartwich, Y., . . . Mor, G. (2013). TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle*, *12*(3), 511-521. doi: 10.4161/cc.23406
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., . . . Bao, S. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, *153*(1), 139-152. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.021
- Cho, K. R., & Shih, M. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, *4*, 287-313. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246
- Christian, F., Smith, E. L., & Carmody, R. J. (2016). The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, *5*(1). doi: 10.3390/cells5010012
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, *17*(3), 313-319. doi: 10.1038/nm.2304
- Cogswell, P. C., Guttridge, D. C., Funkhouser, W. K., & Baldwin, A. S., Jr. (2000). Selective activation of NF- $\kappa$ B subunits in human breast cancer: potential roles for NF- $\kappa$ B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, *19*(9), 1123-1131. doi: 10.1038/sj.onc.1203412
- Conic, I., Dimov, I., Tasic-Dimov, D., Djordjevic, B., & Stefanovic, V. (2011). Ovarian epithelial cancer stem cells. *ScientificWorldJournal*, *11*, 1243-1269. doi: 10.1100/tsw.2011.112
- Craveiro, V., Yang-Hartwich, Y., Holmberg, J. C., Joo, W. D., Sumi, N. J., Pizzonia, J., . . . Mor, G. (2013). Phenotypic modifications in ovarian cancer stem cells following Paclitaxel treatment. *Cancer Med*, *2*(6), 751-762. doi: 10.1002/cam4.115
- Curley, M. D., Therrien, V. A., Cummings, C. L., Sergent, P. A., Koulouris, C. R., Friel, A. M., . . . Foster, R. (2009). CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*, *27*(12), 2875-2883. doi: 10.1002/stem.236
- Dashzeveg, N. K., Taftaf, R., Ramos, E. K., Torre-Healy, L., Chumakova, A., Silver, D. J., . . . Liu, H. (2017). New Advances and Challenges of Targeting Cancer Stem Cells. *Cancer Res*, *77*(19), 5222-5227. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0054
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., & Karin, M. (1996). Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, *16*(4), 1295-1304.
- Dobrzanski, P., Ryseck, R. P., & Bravo, R. (1993). Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol Cell Biol*, *13*(3), 1572-1582.
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, *18*(1), 17-25. doi: 10.1089/scd.2008.0055

- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., . . . De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, *15*(3), 504-514. doi: 10.1038/sj.cdd.4402283
- Erickson, B. K., Conner, M. G., & Landen, C. N., Jr. (2013). The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, *209*(5), 409-414. doi: 10.1016/j.ajog.2013.04.019
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, *136*(5), E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, *10*(2), R25. doi: 10.1186/bcr1982
- Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C. R., Zhu, Z., . . . Kerbel, R. S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res*, *69*(18), 7243-7251. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0167
- Foster, R., Buckanovich, R. J., & Rueda, B. R. (2013). Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness. *Cancer Lett*, *338*(1), 147-157. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.023
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, *7*(5), 1016-1036.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, *109 Suppl*, S81-96.
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, *16*, 225-260. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.225
- Gupta, P. B., Fillmore, C. M., Jiang, G., Shapira, S. D., Tao, K., Kuperwasser, C., & Lander, E. S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*, *146*(4), 633-644. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.026
- Guzman, M. L., Neering, S. J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D. S., Rizzieri, D. A., . . . Jordan, C. T. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, *98*(8), 2301-2307.
- Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, *197*(4302), 461-463.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hao, L., Rizzo, P., Osipo, C., Pannuti, A., Wyatt, D., Cheung, L. W., . . . Miele, L. (2010). Notch-1 activates estrogen receptor-alpha-dependent transcription via IKKalpha in breast cancer cells. *Oncogene*, *29*(2), 201-213. doi: 10.1038/onc.2009.323
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, *132*(3), 344-362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*, *26*(3), 203-234. doi: 10.1101/gad.183434.111
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, *25*(51), 6706-6716. doi: 10.1038/sj.onc.1209933
- Horne, S. D., Pollick, S. A., & Heng, H. H. (2015). Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *Int J Cancer*, *136*(9), 2012-2021. doi: 10.1002/ijc.29031

- Jung, J. G., Shih, I. M., Park, J. T., Gerry, E., Kim, T. H., Ayhan, A., . . . Wang, T. L. (2016). Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. *Cancer Res*, 76(21), 6351-6361. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0980
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, 18, 621-663. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., & Li, Z. W. (2002). NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 301-310. doi: 10.1038/nrc780
- Kendellen, M. F., Bradford, J. W., Lawrence, C. L., Clark, K. S., & Baldwin, A. S. (2014). Canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene*, 33(10), 1297-1305. doi: 10.1038/onc.2013.64
- Kim, M. J., Kim, A. R., Jeong, J. Y., Kim, K. I., Kim, T. H., Lee, C., . . . An, H. J. (2017). Correlation of ALDH1 and Notch3 Expression: Clinical implication in Ovarian Carcinomas. *J Cancer*, 8(16), 3331-3342. doi: 10.7150/jca.18955
- Klotz, D. M., & Wimberger, P. (2017). Cells of origin of ovarian cancer: ovarian surface epithelium or fallopian tube? *Arch Gynecol Obstet*, 296(6), 1055-1062. doi: 10.1007/s00404-017-4529-z
- Kryczek, I., Liu, S., Roh, M., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., . . . Zou, W. (2012). Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer*, 130(1), 29-39. doi: 10.1002/ijc.25967
- Kujawa, K. A., & Lisowska, K. M. (2015). [Ovarian cancer--from biology to clinic]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 69, 1275-1290.
- Kuroda, T., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Yasuda, K., Takahashi, A., Asanuma, H., . . . Sato, N. (2013). ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One*, 8(6), e65158. doi: 10.1371/journal.pone.0065158
- Kusumbe, A. P., Mali, A. M., & Bapat, S. A. (2009). CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells*, 27(3), 498-508. doi: 10.1634/stemcells.2008-0868
- Lee, D. W., Ramakrishnan, D., Valenta, J., Parney, I. F., Bayless, K. J., & Sitcheran, R. (2013). The NF- $\kappa$ B RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma. *PLoS One*, 8(2), e57489. doi: 10.1371/journal.pone.0057489
- Leizer, A. L., Alvero, A. B., Fu, H. H., Holmberg, J. C., Cheng, Y. C., Silasi, D. A., . . . Mor, G. (2011). Regulation of inflammation by the NF- $\kappa$ B pathway in ovarian cancer stem cells. *Am J Reprod Immunol*, 65(4), 438-447. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00914.x
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*, 177(3), 1053-1064. doi: 10.2353/ajpath.2010.100105
- Levanon, K., Crum, C., & Drapkin, R. (2008). New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*, 26(32), 5284-5293. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1107
- Li, J., Fadare, O., Xiang, L., Kong, B., & Zheng, W. (2012). Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis. *J Hematol Oncol*, 5, 8. doi: 10.1186/1756-8722-5-8
- Liu, A., Yu, X., & Liu, S. (2013). Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chin J Cancer*, 32(9), 483-487. doi: 10.5732/cjc.012.10282
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., . . . Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67. doi: 10.1186/1476-4598-5-67

- Liu, M., Sakamaki, T., Casimiro, M. C., Willmarth, N. E., Quong, A. A., Ju, X., . . . Pestell, R. G. (2010). The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*, *70*(24), 10464-10473. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0732
- Liu, Y., Zhang, T., Wu, Q., Jiao, Y., Gong, T., Ma, X., & Li, D. (2017). Relationship between initiation time of adjuvant chemotherapy and survival in ovarian cancer patients: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *Sci Rep*, *7*(1), 9461. doi: 10.1038/s41598-017-10197-1
- Luningschror, P., Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2012). Knockdown of IKK1/2 promotes differentiation of mouse embryonic stem cells into neuroectoderm at the expense of mesoderm. *Stem Cell Rev*, *8*(4), 1098-1108. doi: 10.1007/s12015-012-9402-7
- Luo, J. L., Tan, W., Ricono, J. M., Korchynskyi, O., Zhang, M., Gonias, S. L., . . . Karin, M. (2007). Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature*, *446*(7136), 690-694. doi: 10.1038/nature05656
- Luo, L., Zeng, J., Liang, B., Zhao, Z., Sun, L., Cao, D., . . . Shen, K. (2011). Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol*, *91*(2), 596-602. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.06.005
- Luo, Y., Dallaglio, K., Chen, Y., Robinson, W. A., Robinson, S. E., McCarter, M. D., . . . Fujita, M. (2012). ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells*, *30*(10), 2100-2113. doi: 10.1002/stem.1193
- Madjd, Z., Mehrjerdi, A. Z., Sharifi, A. M., Molanaei, S., Shahzadi, S. Z., & Asadi-Lari, M. (2009). CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun*, *9*, 4.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704-715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., & Pospisek, M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem*, *336*(1), 46-50. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.010
- McAuliffe, S. M., Morgan, S. L., Wyant, G. A., Tran, L. T., Muto, K. W., Chen, Y. S., . . . Dinulescu, D. M. (2012). Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(43), E2939-2948. doi: 10.1073/pnas.1206400109
- McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., & Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, *13*(9), 1400-1412. doi: 10.4161/cc.28401
- Merchant, A. A., & Matsui, W. (2010). Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*, *16*(12), 3130-3140. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2846
- Mor, G., Yin, G., Chefetz, I., Yang, Y., & Alvero, A. (2011). Ovarian cancer stem cells and inflammation. *Cancer Biol Ther*, *11*(8), 708-713.
- Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*, *81*(Pt A), 166-173. doi: 10.1016/j.biocel.2016.09.009
- Murohashi, M., Hinohara, K., Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., . . . Gotoh, N. (2010). Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*, *102*(1), 206-212. doi: 10.1038/sj.bjc.6605468
- O'Dea, E., & Hoffmann, A. (2010). The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(1), a000216. doi: 10.1101/cshperspect.a000216

- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(4), a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034
- Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., & Miele, L. (2010). Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 16(12), 3141-3152. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2823
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(12), 895-902. doi: 10.1038/nrc1232
- Perkins, N. D., & Gilmore, T. D. (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, 13(5), 759-772. doi: 10.1038/sj.cdd.4401838
- Pietras, A., Katz, A. M., Ekstrom, E. J., Wee, B., Halliday, J. J., Pitter, K. L., . . . Holland, E. C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*, 14(3), 357-369. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.005
- Pignata, S., Cannella, L., Leopardo, D., Pisano, C., Bruni, G. S., & Facchini, G. (2011). Chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*, 303(2), 73-83. doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.026
- Pine, S. R., Ryan, B. M., Varticovski, L., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 2195-2200. doi: 10.1073/pnas.0909390107
- Ping, Y. F., & Bian, X. W. (2011). Cancer stem cells switch on tumor neovascularization. *Curr Mol Med*, 11(1), 69-75.
- Ping, Y. F., Yao, X. H., Jiang, J. Y., Zhao, L. T., Yu, S. C., Jiang, T., . . . Bian, X. W. (2011). The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *J Pathol*, 224(3), 344-354. doi: 10.1002/path.2908
- Ping, Y. F., Zhang, X., & Bian, X. W. (2016). Cancer stem cells and their vascular niche: Do they benefit from each other? *Cancer Lett*, 380(2), 561-567. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.010
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), 225-238. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015
- Poveda Velasco, A., Casado Herraes, A., Cervantes Ruiperez, A., Gallardo Rincon, D., Garcia Garcia, E., Gonzalez Martin, A., . . . Group, Geico. (2007). Treatment guidelines in ovarian cancer. *Clin Transl Oncol*, 9(5), 308-316.
- Pratt, M. A., Tibbo, E., Robertson, S. J., Jansson, D., Hurst, K., Perez-Iratxeta, C., . . . Niu, M. Y. (2009). The canonical NF-kappaB pathway is required for formation of luminal mammary neoplasias and is activated in the mammary progenitor population. *Oncogene*, 28(30), 2710-2722. doi: 10.1038/onc.2009.131
- Pylvas-Eerola, M., Liakka, A., Puistola, U., Koivunen, J., & Karihtala, P. (2016). Cancer Stem Cell Properties as Factors Predictive of Chemoresistance in Neoadjuvantly-treated Patients with Ovarian Cancer. *Anticancer Res*, 36(7), 3425-3431.
- Qiao, B., Chen, Z., Hu, F., Tao, Q., & Lam, A. K. (2013). BMI-1 activation is crucial in hTERT-induced epithelial-mesenchymal transition of oral epithelial cells. *Exp Mol Pathol*, 95(1), 57-61. doi: 10.1016/j.yexmp.2013.05.004
- Qiao, B., Gopalan, V., Chen, Z., Smith, R. A., Tao, Q., & Lam, A. K. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition are essential for the acquisition of stem cell properties in hTERT-immortalised oral epithelial cells. *Biol Cell*, 104(8), 476-489. doi: 10.1111/boc.201100077

- Quan, X. X., Hawk, N. V., Chen, W., Coupar, J., Lee, S. K., Petersen, D. W., . . . Van Waes, C. (2018). Targeting Notch1 and IKK $\alpha$  Enhanced NF- $\kappa$ B Activation in CD133(+) Skin Cancer Stem Cells. *Mol Cancer Ther*, 17(9), 2034-2048. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0421
- Razani, B., Reichardt, A. D., & Cheng, G. (2011). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev*, 244(1), 44-54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01059.x
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., . . . De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325), 824-828. doi: 10.1038/nature09557
- Saccani, S., Pantano, S., & Natoli, G. (2003). Modulation of NF- $\kappa$ B activity by exchange of dimers. *Mol Cell*, 11(6), 1563-1574.
- Schatton, T., Frank, N. Y., & Frank, M. H. (2009). Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*, 31(10), 1038-1049. doi: 10.1002/bies.200900058
- Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., van den Born, M., van Es, J. H., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 337(6095), 730-735. doi: 10.1126/science.1224676
- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S. I., Ziegler, P. K., . . . Greten, F. R. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, 152(1-2), 25-38. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012
- Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S. L., Oh, D., . . . Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *J Neurosci*, 32(37), 12950-12960. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012
- Seguin, L., Gozo, M., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2014). Targeting the Achilles' heel of drug-resistant cancer stem cells. *Cell Cycle*, 13(13), 2017-2018. doi: 10.4161/cc.29460
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705-716.
- Shaw, F. L., Harrison, H., Spence, K., Ablett, M. P., Simoes, B. M., Farnie, G., & Clarke, R. B. (2012). A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 17(2), 111-117. doi: 10.1007/s10911-012-9255-3
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*, 21(6), 349-353. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.001
- Shih, V. F., Tsui, R., Caldwell, A., & Hoffmann, A. (2011). A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*, 21(1), 86-102. doi: 10.1038/cr.2010.161
- Shostak, K., & Chariot, A. (2011). NF- $\kappa$ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*, 13(4), 214. doi: 10.1186/bcr2886
- Siebenlist, U., Franzoso, G., & Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 405-455. doi: 10.1146/annurev.cb.10.110194.002201
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1), 7-30. doi: 10.3322/caac.21332
- Silva, I. A., Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., . . . Buckanovich, R. J. (2011). Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res*, 71(11), 3991-4001. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3175
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., . . . Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401. doi: 10.1038/nature03128

- Singh, S., Shi, Q., Bailey, S. T., Palczewski, M. J., Pardee, A. B., Iglehart, J. D., & Biswas, D. K. (2007). Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 6(7), 1973-1982. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0063
- Smalley, M., & Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*, 3(11), 832-844. doi: 10.1038/nrc1212
- Smith, S. M., & Cai, L. (2012). Cell specific CD44 expression in breast cancer requires the interaction of AP-1 and NFkappaB with a novel cis-element. *PLoS One*, 7(11), e50867. doi: 10.1371/journal.pone.0050867
- Song, L. L., Peng, Y., Yun, J., Rizzo, P., Chaturvedi, V., Weijzen, S., . . . Miele, L. (2008). Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene*, 27(44), 5833-5844. doi: 10.1038/onc.2008.190
- Steg, A. D., Bevis, K. S., Katre, A. A., Ziebarth, A., Dobbin, Z. C., Alvarez, R. D., . . . Landen, C. N. (2012). Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 18(3), 869-881. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2188
- Stehman, F. B., Brady, M. F., Thigpen, J. T., Rossi, E. C., & Burger, R. A. (2012). Cytokine use and survival in the first-line treatment of ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*, 127(3), 495-501. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.09.002
- Stewart, J. M., Shaw, P. A., Gedye, C., Bernardini, M. Q., Neel, B. G., & Ailles, L. E. (2011). Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(16), 6468-6473. doi: 10.1073/pnas.1005529108
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724. doi: 10.1038/nature07943
- Sun, L., Mathews, L. A., Cabarcas, S. M., Zhang, X., Yang, A., Zhang, Y., . . . Farrar, W. L. (2013). Epigenetic regulation of SOX9 by the NF-kappaB signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. *Stem Cells*, 31(8), 1454-1466. doi: 10.1002/stem.1394
- Sun, S. C. (2010). Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci Signal*, 3(123), pe18. doi: 10.1126/scisignal.3123pe18
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*, 21(1), 71-85. doi: 10.1038/cr.2010.177
- Szotek, P. P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P. T., Dinulescu, D. M., Connolly, D., Foster, R., . . . Donahoe, P. K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(30), 11154-11159. doi: 10.1073/pnas.0603672103
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi-Yanaga, F., & Kahn, M. (2010). Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res*, 16(12), 3153-3162. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2943
- Telleria, C. M. (2013). Repopulation of ovarian cancer cells after chemotherapy. *Cancer Growth Metastasis*, 6, 15-21. doi: 10.4137/CGM.S11333
- Varas-Godoy, M., Rice, G., & Illanes, S. E. (2017). The Crosstalk between Ovarian Cancer Stem Cell Niche and the Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int*, 2017, 5263974. doi: 10.1155/2017/5263974
- Wang, B., Wang, Q., Wang, Z., Jiang, J., Yu, S. C., Ping, Y. F., . . . Bian, X. W. (2014). Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells. *Cancer Res*, 74(20), 5746-5757. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2563

- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., . . . Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, *468*(7325), 829-833. doi: 10.1038/nature09624
- Webb, P. M., & Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, *41*, 3-14. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006
- Wei, X., Dombkowski, D., Meirelles, K., Pieretti-Vanmarcke, R., Szotek, P. P., Chang, H. L., . . . Donahoe, P. K. (2010). Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(44), 18874-18879. doi: 10.1073/pnas.1012667107
- Weiderpass, E., & Labreche, F. (2012). Malignant tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work*, *3*(3), 166-180. doi: 10.5491/SHAW.2012.3.3.166
- Weina, K., & Utikal, J. (2014). SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*, *3*, 19. doi: 10.1186/2001-1326-3-19
- Welte, Y., Adjaye, J., Lehrach, H. R., & Regenbrecht, C. R. (2010). Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal*, *8*(1), 6. doi: 10.1186/1478-811X-8-6
- Wen, Y., Hou, Y., Huang, Z., Cai, J., & Wang, Z. (2017). SOX2 is required to maintain cancer stem cells in ovarian cancer. *Cancer Sci*, *108*(4), 719-731. doi: 10.1111/cas.13186
- Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., & Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, *423*(6940), 655-659. doi: 10.1038/nature01576
- Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*, *4*(9), 1033-1043. doi: 10.5966/sctm.2015-0048
- Yao, X. H., Ping, Y. F., Chen, J. H., Xu, C. P., Chen, D. L., Zhang, R., . . . Bian, X. W. (2008). Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR. *J Pathol*, *215*(4), 369-376. doi: 10.1002/path.2356
- Ye, X. Z., Xu, S. L., Xin, Y. H., Yu, S. C., Ping, Y. F., Chen, L., . . . Bian, X. W. (2012). Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J Immunol*, *189*(1), 444-453. doi: 10.4049/jimmunol.1103248
- Yin, G., Alvero, A. B., Craveiro, V., Holmberg, J. C., Fu, H. H., Montagna, M. K., . . . Mor, G. (2013). Constitutive proteasomal degradation of TWIST-1 in epithelial-ovarian cancer stem cells impacts differentiation and metastatic potential. *Oncogene*, *32*(1), 39-49. doi: 10.1038/onc.2012.33
- Yoo, Y. D., & Kwon, Y. T. (2015). Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. *J Anal Sci Technol*, *6*(1), 28. doi: 10.1186/s40543-015-0071-4
- Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O., & Ladman, A. J. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*, *37*(10), 3639-3643.
- Zandi, E., Chen, Y., & Karin, M. (1998). Direct phosphorylation of I-kappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science*, *281*(5381), 1360-1363.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H. C., Matej, D., Schilder, J. M., . . . Nephew, K. P. (2008). Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*, *68*(11), 4311-4320. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364
- Zhang, W., Tan, W., Wu, X., Poustovoitov, M., Strasner, A., Li, W., . . . Karin, M. (2013). A NIK-IKKalpha module expands ErbB2-induced tumor-initiating cells by stimulating nuclear export of p27/Kip1. *Cancer Cell*, *23*(5), 647-659. doi: 10.1016/j.ccr.2013.03.012

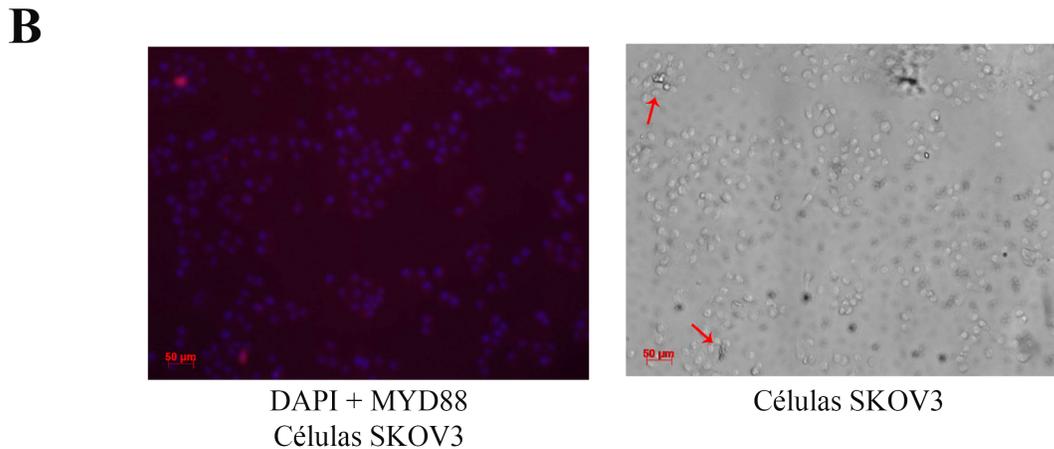
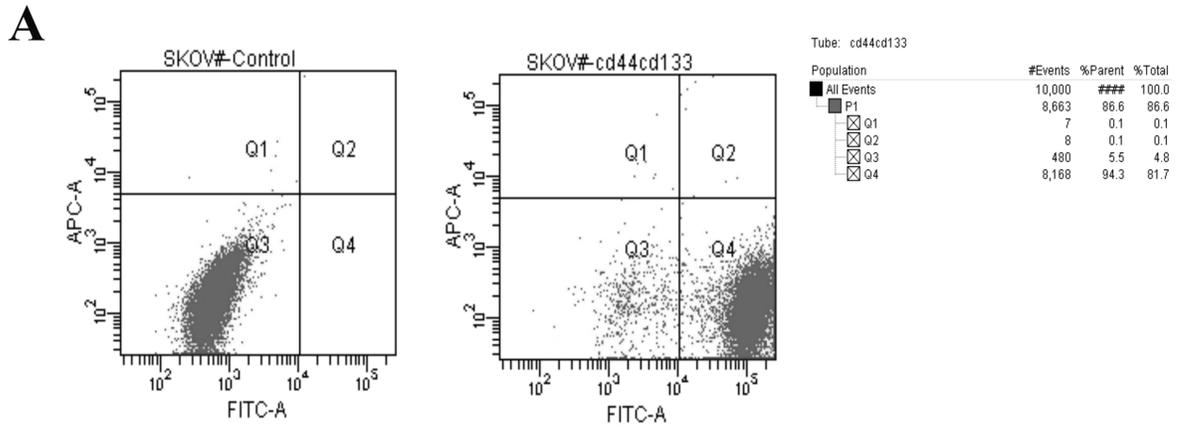
Zhou, W., Ke, S. Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., Paul, J., . . . Bao, S. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*, 17(2), 170-182. doi: 10.1038/ncb3090

## XII. ANEXOS

12.1 Tabla 1. Lista de genes empleados en la caracterización de Células Troncales Tumorales en Células SKOV3.

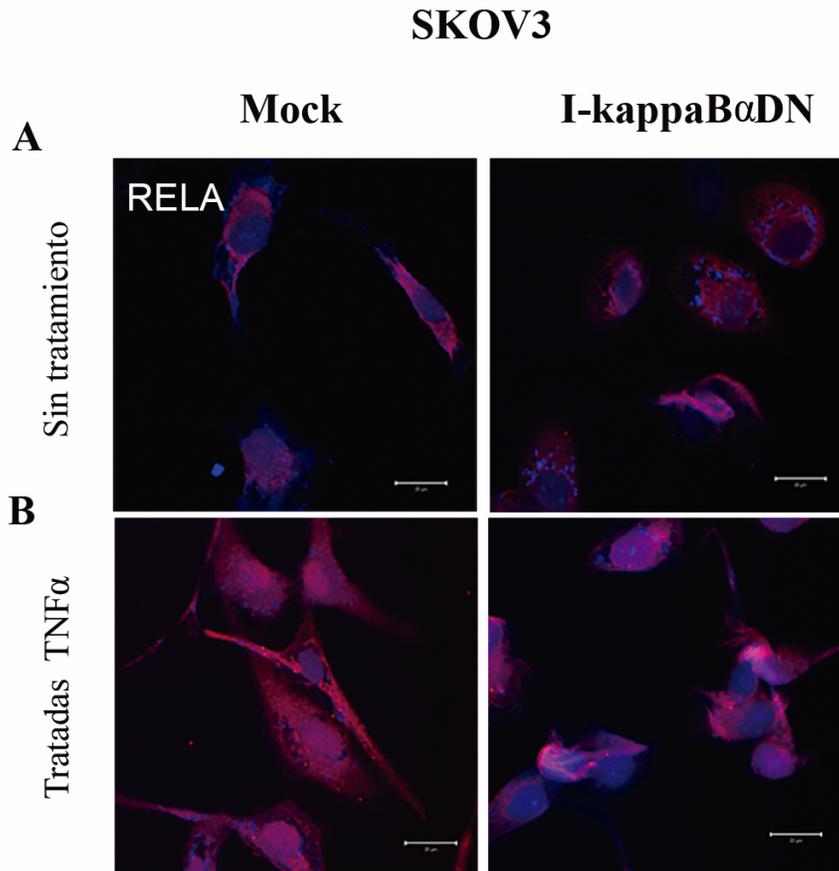
Gene	Secuencia	TM (° C) alincamiento
ESA F	GCTGCACACAACCTCAATCTCA	56
ESA R	GGAAGCTGAGTGCAAGAAGG;	
NANOG F	CCAGTC CCAAAGGCAAAC	56
NANOG R	AGGCATCCCTGGTGGT	
SOX F	AGGAGTTGTCAAGGCAGAG,	56
SOX R	CCGCC GATGATTGTTATT	
OCT4 F	TGCCCATTTATGAGGGCTAC	56
OCT4 R	TGCTCTTGTAGGTGGTCTCG	
IKK $\alpha$ F	GACTTGATGGAATCTCTGGA	56
IKK $\alpha$ R	GATGCCAT ATTTCTTTCTGC	
CD44 F	CAACACAAATGGCTGGTACG	55
CD44 R	GTGTGGTTGAAATG GTGCTG;	
RELA F	TCTGCTTCCAGGTGACAGTG	57
RELA R	ATCTTGAGCTCGGCAGTGTT	
RELB F	TCCAACCAG GATGTCTAGC	56
RELB R	AGCCATGTCCCTTTTCCTCT	
P50 F	CCTGGATGACTGTTGGGAAA	56
P50 R	TCAGCCAGCTGTTTCATGTC	
P52 F	GAACAGCCTTGCATCTAGCC	56
P52 R	TCCGAGTCGCTATCAGAGGT	
TBP F	CCACAGCTCTTCCACTCACA	56
TBP R	CTCATGATTACCGCAGCAA	

## 12.2 Figura Suplementaria 1.



**Figura suplementaria 1. Identificación de CTTs en la línea SKOV3 de cáncer de ovario.** A) Inmuno-detección de la población CD44 y CD133 positiva (panel derecho, población Q2) de la línea SKOV3, comparado con la línea total SKOV3, (panel izquierdo), mediante citometría de flujo. B) Inmuno-detección negativa de células positivas a MYD88 con DAPI para identificación de los núcleos en células SKOV3 (panel izquierdo) campo claro (panel derecho).

12.3 Figura Suplementaria 2.



**Figura suplementaria 2. Inmunodetección de RelA en células SKOV3 con inhibición de la vía de señalización NF-kB.** A) Localización de la proteína RelA en la población de células SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y línea celular control Mock (PLXSN) sin tratamiento B) Localización de la proteína RelA en la población de células SKOV3 (I-kB $\alpha$ DN) y línea celular control Mock (PLXSN) tratadas con 10ng/ml de TNF $\alpha$ . Imágenes con Anticuerpo específico.



## ORIGINAL ARTICLE

NF- $\kappa$ B Participates in the Stem Cell Phenotype of Ovarian Cancer Cells

Carolina Gonzalez-Torres,<sup>a</sup> Javier Gaytan-Cervantes,<sup>b</sup> Karla Vazquez-Santillan,<sup>a</sup>  
Edna Ayerim Mandujano-Tinoco,<sup>a</sup> Gisela Ceballos-Cancino,<sup>b</sup> Alfredo Garcia-Venzor,<sup>a</sup>  
Cecilia Zampedri,<sup>b</sup> Paulina Sanchez-Maldonado,<sup>b</sup> Raul Mojica-Espinosa,<sup>c</sup>  
Luis Enrique Jimenez-Hernandez,<sup>a</sup> and Vilma Maldonado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Epigenética del Cáncer

<sup>b</sup>Laboratorio de genómica funcional del cáncer

<sup>c</sup>Unidad de Microarreglos, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México

Received for publication November 13, 2016; accepted August 24, 2017 (ARCMED-D-16-00707).

**Background.** NF- $\kappa$ B is a transcription factor involved in cancer stem cells maintenance of many tumors. Little is known about the specific stem-associated upstream regulators of this pathway in ovarian cancer. The Aim of the study was to analyze the role of the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways in stem cells of ovarian cancer cell lines.

**Methods.** Stem cells were isolated using sorting cytometry. Western blot and RT-PCR were used to quantify protein and messenger RNA levels. Loss and gain of function assays were performed using siRNAs and dominant-negative proteins, respectively. NF- $\kappa$ B binding activity was measured with a reporter gene assay. The stem phenotype was estimated with clonogenic assays using soft agar, colony formation, oospheres formation and *in vivo* tumorigenicity assays.

**Results.** The CD44+ subpopulation of SKOV3 ovarian cancer cell line presented higher mRNA levels of key stemness genes, an increased tumorigenic capacity and higher expression of the RelA, RelB and IKK $\alpha$ . When the canonical pathway was inhibited by means of a dominant-negative version of I $\kappa$ B $\alpha$ , the stem cell population was reduced, as shown by a reduced CD44+ subpopulation, a decrease in the expression of the stemness genes and a reduction of the stem phenotype. In addition, IKK $\alpha$ , the main upstream non-canonical kinase, was highly expressed in the CSC population. Accordingly, when IKK $\alpha$  was inhibited using shRNAs, the expression of the stemness genes was reduced.

**Conclusions.** This report is the first to show the importance of several elements of both NF- $\kappa$ B pathway in maintaining the ovarian cancer stem cell population. © 2017 Published by Elsevier Inc. on behalf of IMSS.

**Key Words:** Ovarian cancer, NF- $\kappa$ B, Stem cell, Canonical pathway, Non-canonical pathway, IKK $\alpha$ .

## Introduction

Ovarian cancer ranks eighth among the leading causes of death in women worldwide (1). Ovarian tumors are characterized by a rapid progression to metastasis, which restricts effective treatment options (1–3). It has been proposed that the recurrence of ovarian cancer may be due to a cellular population known as cancer stem cells (CSCs). These cells resist chemotherapy (4), have the ability to self-renew,

evade apoptosis and survive in unfavorable microenvironments (5,6). Bapat et al. (7) were the first to isolate a cellular subpopulation with stem characteristics from ovarian cancer samples using the transmembrane glycoprotein CD44 as an enrichment marker. Additional studies using this marker showed that as few as 100 dissociated CD44+ cells allowed full recapitulation of the parent tumor, whereas more than 10<sup>5</sup> CD44– cells were needed to form a tumor in *in vivo* models. Furthermore, the isolated CD44+ cells presented resistance to chemotherapy (8,9).

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is a transcription factor implicated in cancer development through the regulation of numerous genes, including oncogenes (10). Recent studies

Address reprint requests to: Vilma Maldonado, Laboratorio de Epigenética del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610, Ciudad de México, México; Phone: (+52) (55) 5350-1900; E-mail: [vmaldonado@inmegen.gob.mx](mailto:vmaldonado@inmegen.gob.mx)

showed that CSCs derived from ovarian cancer exhibit constitutive NF- $\kappa$ B activation (11,12). Alvero et al. showed that ovarian CSCs with the CD44+MYD88+ phenotype were capable of regenerating the original tumor *in vivo*; these cells exhibited greater DNA repair capacity, increased resistance to apoptosis, and constitutive NF- $\kappa$ B activation (13). A recent report showed that CSCs from ovarian cell lines die by apoptosis upon exposure to ericocalyxin B, which interferes with the nuclear translocation of RelA (p65) (14). Similarly, NF- $\kappa$ B is important for the CSC self-renewal process from ovarian cancer, through the up-regulation and activation of TLR2 by MYD88 signaling (15).

The activation of NF- $\kappa$ B has been divided into two main pathways (16). The canonical or “classical” pathway depends on the I $\kappa$ B kinase complex formed by the catalytic subunits IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  and the IKK $\gamma$  (NEMO) regulatory subunit. This complex phosphorylates the I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor at serine residues 32/36, which allows the translocation and nuclear activation of the p50/RelA (p50/p65) dimer. The non-canonical pathway is initiated when the NF- $\kappa$ - $\beta$ -inducing kinase (NIK) is stabilized and the IKK $\alpha$  homodimer is phosphorylated (17), which in turn induces the degradation of the C-terminus of p100, releasing the p52/RelB heterodimer (18).

A key protein in the activation of both pathways NF- $\kappa$ B is I- $\kappa$ B kinase alpha (IKK $\alpha$ /IKK1). This kinase is involved in the growth and maintenance of several cancer types and has been implicated as a driver of the metastatic process (19). There is evidence to suggest that IKK $\alpha$  plays an important role in cellular stemness. For example, knock-down of IKK $\alpha$  promotes differentiation of ESCs into neuroectoderm (20). In addition, an IKK $\alpha$  module expands breast cancer tumor-initiating cells by stimulating nuclear export of p27/Kip1 (21). McAliffe reported that Notch plays a key role in the maintenance of CSCs in ovarian cancer cells (22). Since Notch-1 associates with IKK $\alpha$  and regulates its activity in cervical cancer cells, it could be also involved in the regulation of stemness in ovarian cancer cells (23,24). Finally, it has been shown that IKK $\alpha$  inactivation blocks the ability of Neu/ErbB2-induced tumor to generate secondary tumor transplants in orthotopic models, and inhibits the self-renewal ability of breast cancer progenitors (25). However, little is known of its role in ovarian cancer and cancer stem cells. In this article we identified NF- $\kappa$ B proteins that were differentially regulated in CSCs from an ovarian cancer cell line and test their role in maintaining the stemness phenotype.

## Materials and Methods

### Cell Lines and Culture Conditions

The ovarian cancer cell line SKOV3 was obtained from the ATCC, cultured, and grown as monolayers in DMEM (GIBCO BRL, MD, USA) with 10% FBS (GIBCO BRL, MD, USA) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Flow Cytometry Analysis

Ovarian cancer cells (1x10<sup>6</sup> cells/mL) were fixed with 4% paraformaldehyde and resuspended in 1% FBS. Cells were incubated with a CD44-FITC antibody (dilution 1:11, mouse anti-human CD44-FITC), (BD Pharmingen, CA, USA) at 4°C. The IgG1-FITC antibody was used as an isotype control (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Ovarian cancer cells (3x10<sup>7</sup>) were resuspended in 1% FBS followed by incubation with the CD44-FITC antibody (dilution 1:11) for 30 min. The CD44+ and CD44- cells populations were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) based on CD44 positivity. Flow cytometry data were obtained in a FACS Arias sorter (BD Biosciences, CA, USA).

### Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA was isolated using Trizol reagent (Life Technologies, TX, USA). RT-PCR was performed using a cDNA synthesis kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, AB, CA, USA) following the manufacturer's instructions; genes were amplified using AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, CA, USA). Oligonucleotide sequences are described in [Supplementary Figure 1](#). TATA-binding protein (TBP) was used as an internal control in all reactions.

### Semi-quantitative and Quantitative PCR

The expression levels of each gene were determined by semi-quantitative and real-time quantitative PCR (qPCR) using SYBR Green (Thermo Scientific, IL, USA). qPCR was performed using a QuantStudio 7 system (Applied Biosystems by Thermo Scientific, CA, USA) with the following program: initial denaturation for 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of PCR (95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 30 s). Afterward, an additional cycle designed by the QuantStudio software (95°C for 60 s, 55°C for 30 s, and 95°C for 30 s) was added for the melting curve analysis. The primer sequences are listed in S1 Table. The geometric mean of the house-keeping gene TBP was used as an internal control to normalize the variability in expression levels. The results were analyzed by the comparative 2<sup>- $\Delta$ CT</sup> (2 $\Delta$ CT) method to calculate the expression levels of genes. The plotted results include the mean  $\pm$  SD from three independent biological replicates. Primers: ESAP GCTGCACACAACTCAATCTCA, ESAR GGAAGCTGAGTGCAAGAAGG; NANOGF CCAAGTCCAAAGGCAAAC, NANOR AGGCATCCCTGGTGGT, SOX2F AGGAGTTGTCAAGGCAGAG, SOX2R CCGCCGATGATTGTTATT; OCT4F TGCCATTATGAGGGC TAC OCT4RC TGCTCTTGTAGGTGGTCTCG, IKK $\alpha$ F GACTTGATGGAATCTCTGGA, IKK $\alpha$ R, GATGCCATATTCTTTCTGTC, TBPFCACAGCTCTTCCACTCACA, TBPR CTATGATTACCGCAGCAAA, CD44F CAACA

CAAATGGCTGGTACG, CD44R GTGTGGTTGAAATG GTGCTG; RELAF TCTGCTCCAGGTGACAGTG RELR ATCTTGAGCTCGGCAGTGTT RELBF TCCCAACCAG GATGTCTAGC, RELBR AGCCATGTCCCTTTTCCTCT.

#### *Clonogenic Assay Using Soft Agar*

In vitro tumorigenicity and anchorage-independent growth were determined using a colony formation assay. Cells ( $1 \times 10^4$ ) were resuspended in a 0.3% agar solution supplemented with media and poured on 1% agar layer-covered plates. Cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for three weeks (26), after were fixed and stained with 0.01% Crystal Violet and counted.

#### *Colony Formation Assay*

CD44+ and CD44- cells were seeded in 48 well plates, with  $1 \times 10^3$  cells in the first well and serial 1:2 dilutions in the rest of the wells. All the experiments included three independent biological replicates. Cells were incubated to form colonies for 1–3 weeks, then fixed with 70% ethanol, stained with 1% crystal violet dye, and counted.

#### *Ovospheres Formation Assay*

CD44+ and CD44- cells ( $1 \times 10^5$ ) were plated in non-adherent culture flasks and incubated under orbital motion with Leibovitz L-15 medium (Gibco BRL, Rockville MD) supplemented with 5% FBS for 15 d. The diameter of the spheroids was determined using images taken with an AxioCam (Zeiss) optical microscope. The volume of 10 spheroids was calculated using the formula  $V = 4/3\pi a b c$  (27). Three consecutive ovospheres cell passages were conducted every 8–15 d, which involved disaggregating the ovospheres with Accutase (Chemicon, VA, USA), counting them, and reseeding the same number of cells for new ovospheres formation.

#### *In Vivo Tumorigenicity Assay*

Nu/nu immunodeficient nude mice (age 6–8 weeks) were maintained in the Metropolitan Autonomous University's animal facility, following the animal care ethical guidelines approved by the "Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales" (SAGARPA) (approval # AUT-B-C-0215-016). All surgeries were performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Tumorigenicity was evaluated by subcutaneous injection of  $1 \times 10^5$  CD44+ and CD44- populations in 1:1 Matrigel: PBS (BD Biosciences, CA, USA) (Controls with Matrigel: PBS). Tumor growth was monitored over a three week period, after which the mice were sacrificed for tumor extraction. The tumors were fixed with 4% paraformaldehyde for histological examination (H&E staining).

#### *Zebrafish Xenotransplant Assays*

Zebrafish (*Danio rerio*) of the AB genetic background (donated from Dr. Hilda Lomely from IBT-UNAM) were maintained at a temperature of 28.5°C on a pH of 7.2–7.4 with a 14 hr on and 10 hr off light cycle. The embryos were raised in Embryo Medium (EM) egg water during the experiments (28).

#### *Xenotransplant in Zebrafish*

For xenotransplant experiment, two days post-fertilization (dpf) zebrafish embryos were dechorionated and anesthetized with tricaine (MS-222; Sigma), and then microinjected with cancer cells into the middle of embryonic yolk sac region. For xenotransplant dilution assays, both SKOV3-PLXSN and SKOV3-IKB cells were re-suspended at a concentration of  $10^6$  cells/100  $\mu$ l and microinjection curves with 50, 100, and 200 cells were tested.

Microinjections were carried out loading the cells into a borosilicate glass needle (Sutter Instrument) pulled by a vertical pipette puller (Model 51210, Stoelting). The cells were injected using a Pneumatic Pico-Liter Injector (PLI-100A; Warner Instruments). After injection, each zebrafish was washed once with EM egg water, and incubated at 34°C. About 20 embryos were used for each group of cells and documented by photography at three days post injection. Husbandry conditions were followed as normal recommendations, fish water was changed daily, and larva that survived for more than five d old were fed twice a day with grinded brine shrimp.

#### *Cell Immunofluorescence*

CD44+ and CD44- cells were cultured in Permanox<sup>®</sup> multi-well plates (Chamber Slide, Lab-Tek) for 48 h, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, incubated overnight at 4°C with the primary antibody, and, after 12 h, incubated with a Cy3-conjugated secondary antibody (Millipore, Bedford, MA, USA). Cells were stained with DAPI (Vectashield) and viewed using a confocal microscope (Carl Zeiss). The photographs were taken with the same exposure time.

#### *Western Blot Protein Analysis*

Protein was extracted with RIPA lysis buffer (1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, and 1% SDS, supplemented with 100 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride). Proteins (20  $\mu$ g) were subjected to 10% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Blots were incubated with the specific primary antibody. After 12 h, the blots were incubated with a specific HRP-conjugated secondary antibody for one hour at room temperature. Finally, the blots were subjected to a chemiluminescence reaction (Immobilon Western-Millipore) and visualized using the Versa Doc Imaging System (Bio-Rad). The primary and secondary

antibodies used: RelB (Sc-28689); p65 (Sc-372); p52 (Sc-848); I $\kappa$ B $\alpha$  (Sc-371) p-I $\kappa$ B $\alpha$  (Sc-8404); IKK $\alpha$  (Sc7182); GAPDH (Sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA), anti-Rabbit IgG-HRP (W401B); Anti mouse IgG HRP (W402B, Promega Corporation Fitchburg, USA).

#### *NF- $\kappa$ B Pathway Modulation*

SKOV3 cells were seeded in 6 well plates one day before transfection. The cells were transfected with 2  $\mu$ g of a dominant-negative I $\kappa$ B $\alpha$  (mutated at I $\kappa$ B $\alpha$ -S32/I $\kappa$ B $\alpha$ -S36) plasmid donated by Dr. P. Bauerle (University of Munich), and the empty vector PLXSN (Mock) was used as a control. After 24 h, the transfection medium was replaced with fresh medium containing G418. Stable cells were selected over four weeks with 900  $\mu$ g/mL G418 (GIBCO, Life Technologies). The expression of specific proteins and RNA was evaluated by Western blot and RT-PCR.

#### *shRNA Constructions and Transfections*

For knockdown experiments, oligonucleotides obtained from Integrated DNA Technologies were cloned into a pSIREN vector (Clontech, CA, USA) to codify shRNAs directed against, IKK $\alpha$ 1 or IKK $\alpha$ 2. The following sequences were used: shRNA- IKK $\alpha$ 1: 5'-GTGATAGCTA-TATGGTTTA-3'; shRNA-IKK $\alpha$ 2: 5'-GTGCCATTGATC-TATATAA-3'. An shRNA directed against luciferase (shRNA-Luc) was employed as a control. SKOV3 cells were seeded in 6 well plates. After 1 day, the cells were transfected with 2  $\mu$ g of either plasmid with Lipofectamine LTX (LT Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, the transfection medium was replaced with fresh medium. The I $\kappa$ B $\alpha$ , and IKK $\alpha$  expression was measured 48 h post-transfection. Two biological replicates were used.

#### *NF- $\kappa$ B Binding Activity with a Reporter Gene Assay*

Previously transfected clones were co-transfected using Lipofectamine LTX with the pNF- $\kappa$ B-MetLuc2 reporter vector, using the SEAP2 vector (Clontech, CA) as a normalization control. To measure NF- $\kappa$ B activity, the Ready Glow Secreted Luciferase Reporter Assay kit was used (Clontech, CA). The secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) was measured using the Great EscAPe SEAP Chemiluminescence 2.0 kit (Clontech, CA) according to the manufacturer's instructions, in a DTX880 multimodal detector (Beckman Coulter, CA). Three independent biological assays were performed for each point. All TNF $\alpha$  assays were conducted using a 10 ng/mL concentration of the cytokine.

#### *Expression Analysis of Fluorescence Micrographs*

The RelA and RelB protein expression analyses of fluorescence micrographs in CD44 $-$  and CD44 $+$  SKOV3 cell populations were performed with the software ImageJ 1.33, as described in McCloy et al., (29).

#### *Statistical Analysis*

Data are presented as the mean  $\pm$  SD; the error bars are representative of three independent experiments (biological replicates). GraphPad (Prism) software was used for statistical analysis. The mean values of two groups were compared by unpaired Student's *t* test. Statistical significance was accepted for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*). The value of *p* is displayed in the Figure, where applicable.

#### **Results**

CD44 $+$  cells exhibit stem cell-like properties and expression of NANOG, OCT4 and SOX2.

We used the CD44 cell surface marker to identify and isolate CSCs from the SKOV3 ovarian cancer cell line using flow cytometry, as reported previously by several groups (7,9,13). We found between 65–72% CD44 positive cells in this cell line (data submitted but not shown).

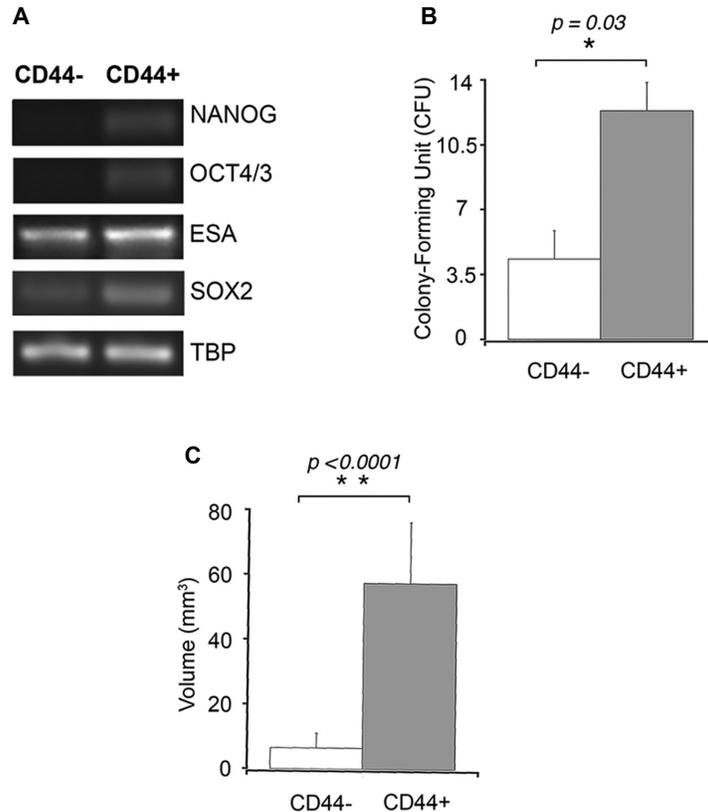
To corroborate the CD44 $+$  stem cell-like phenotype, the relative expression of stem cell genes was analyzed using semi-quantitative PCR and qPCR. As shown in Figure 1A, when compared to CD44 $-$  cells, CD44 $+$  cells exhibited higher expression levels of NANOG, SOX2 and OCT4/3.

#### *Clonogenic and Ovospheres Formation Capacity*

To verify the enhanced tumorigenicity of the isolated CSCs, a clonogenic assay of SKOV3 CD44 $+$  and CD44 $-$  subpopulations was performed. The Figure 1B shows that CD44 $+$  cells formed a greater number of colonies than CD44 $-$  cells. The self-renewal and autonomous growth capacities of CD44 $+$  cells were measured using ovospheres formation assays. The ovospheres of the SKOV3 CD44 $-$  subpopulation were approximately 5  $\mu$ m<sup>3</sup>, whereas those derived from the CD44 $+$  subpopulation reached 55  $\mu$ m<sup>3</sup> (Figure 1C). Serial passaging, a commonly used surrogate marker for CSC enrichment, showed that the spheroids derived from the CD44 $-$  cells formed ovospheres only in the first passage, whereas the CD44 $+$  cells formed spheres over three consecutive passages (Figure 2A).

#### *Evaluation of Tumorigenicity in Nude Mice*

To determine the tumorigenic potential of SKOV3 CD44 $+$  and CD44 $-$  cells, xenotransplantation in nu/nu mice were performed. A large difference in the tumor growth between the two cell subpopulations was observed (Figure 3A and 3B). CD44 $+$  tumors were 12  $\pm$  0.6 mm in diameter on average, whereas CD44 $-$  tumors had an average diameter of 4.6  $\pm$  0.25 mm after 15 d. The tumors lacked inflammatory zones, and most cells formed tumor tissue as corroborated with hematoxylin and eosin stains (data submitted but not shown).



**Figure 1.** Characterization of CD44 ovarian cancer positive cells. (A) Expression levels of the stem cell genes in CD44<sup>-</sup> and CD44<sup>+</sup> cells derived from the SKOV3 cell line, representative gels are shown. The expression of the constitutive gene TBP was used as a loading control. (B) Graphical representation of the average number of colonies formed by SKOV3 CD44<sup>-</sup> and CD44<sup>+</sup> cells. The data represent the average  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (C) The bar graph represents the difference in the growth (mm<sup>3</sup>) of CD44<sup>-</sup> cells compared with CD44<sup>+</sup> cells. Error bars represent the SD from three biological replicate with three experimental replicates. The statistical differences are show with the  $p$  value.

#### Expression NF- $\kappa$ B Subunits in Ovarian CSCs

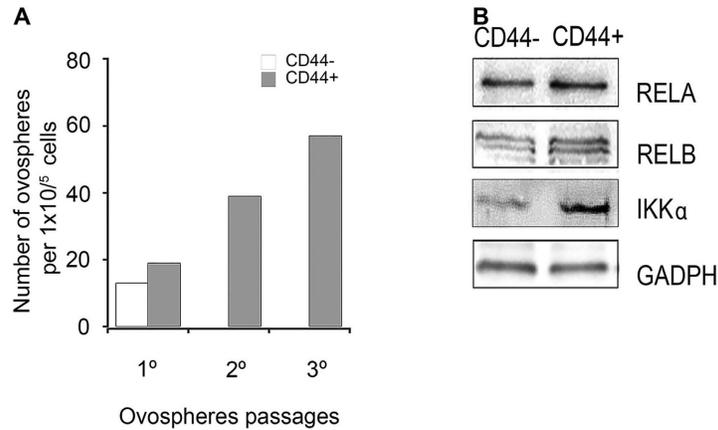
We then measured the expression of several NF- $\kappa$ B family members in stem and non-stem SKOV3 cells. As shown in Figure 2B western blot analyses showed an increase of RelA, RelB, and IKK $\alpha$  protein level in the SKOV3 CSCs when compared to the non-CSC subpopulation which was consistent with additional immunofluorescence results for RelA and RelB (data submitted but not shown).

#### Participation of the Canonical NF- $\kappa$ B Pathway and IKK $\alpha$ in the Ovarian CSC Phenotype

To corroborate the role of the NF- $\kappa$ B canonical pathway in the ovarian cancer stem phenotype, we used the SKOV3

IkB $\alpha$ DN cell line, which expresses the dominant-negative IkB $\alpha$  mutant. As expected, SKOV3 IkB $\alpha$ DN cells expressed higher IkB $\alpha$  protein levels with a relatively lower proportion of the phosphorylated form of IkB $\alpha$  (p-IkB $\alpha$ ) (Supplementary Figure 1). In accordance, the canonical pathway was successfully inhibited, as shown by gene reporter assays after TNF $\alpha$  exposure (Supplementary Figure 2A). Inhibition of the canonical pathway reduced the percentage of CD44<sup>+</sup> cells from 65.3–27.7%.

In the same way, the number of ovospheres in SKOV3 IkB $\alpha$ DN cells was significantly lower than that in SKOV3 mock cells ( $p < 0.01$ ) after 8 d of growth (Supplementary Figure 2B). Supporting these data, we found that the inhibition of the canonical pathway reduced

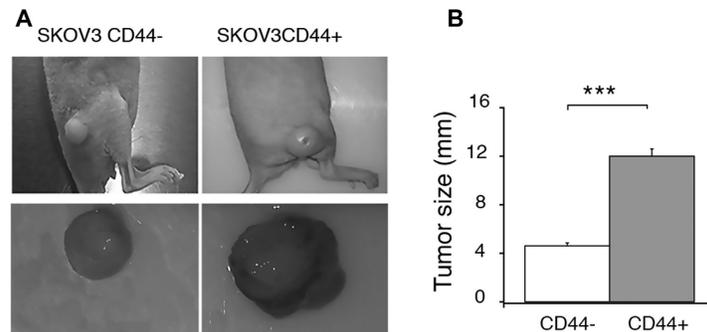


**Figure 2.** Ovospheres capacity and expression of RelA, RelB and IKK $\alpha$ , in ovarian cancer non-CSCs and CSCs. (A) Representation of the number of ovospheres in different serial passages of two experiments originating from CD44<sup>-</sup> and CD44<sup>+</sup> cells. (B) Diameter (mm) of tumors from SKOV3 CD44<sup>+</sup> and CD44<sup>-</sup> cells. Statistical analyses were performed using Student's t test, the statistical differences are shown with the *p* value. (C) Western blots of the proteins RelA, RelB, and IKK $\alpha$  in non-CSCs and CSCs of the SKOV3 cell lines. A GAPDH antibody was used as a loading control in the Western blots; TBP was used as a constituent gene for the RT-PCR assays.

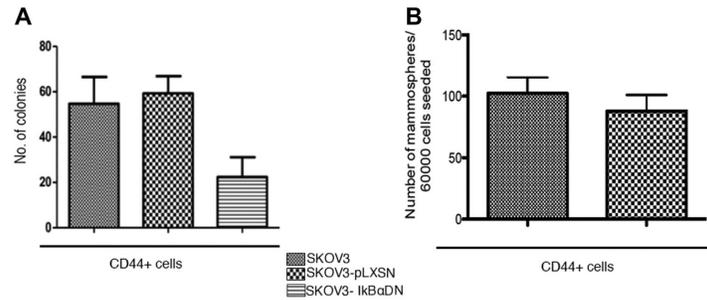
the amount of CD44 mRNA and the stemness genes NANOG and ESA (Supplementary Figure 1B). In addition, as we also found a decrease in median fluorescence intensity (MFI) of CD44<sup>+</sup> SKOV3 I $\kappa$ B $\alpha$ DN cells compared with CD44<sup>+</sup> SKOV3pLXSN cells (Supplementary Figure 3A and 3B). Following these results, we measured the clonogenic ability of isolated CD44<sup>+</sup> cells and, as shown in Figure 4A, we found a decreased clonogenic capacity of CD44<sup>+</sup> cells expressing I $\kappa$ B $\alpha$ DN. We were unable to find differences in their capacity to form ovospheres, suggesting that suppressing the canonical NF $\kappa$ B pathway decreased the number of stem cells, but not the ability of these cells to generate progeny (Figure 4A and 4B).

Finally, to determine the tumorigenic potential of SKOV3I $\kappa$ B $\alpha$ DN cells compared with SKOV3pLXSN cells, we assessed tumor formation at 72 h in these cell lines injected into the yolk sac of zebrafish embryos. As shown in Figure 5 extreme limiting dilution assay (ELDA) showed significant differences between both cell lines, as less tumor-initiating cells were found in the SKOV3I $\kappa$ B $\alpha$ DN cells when compared to the SKOV3pLXSN cell line.

IKK $\alpha$  is an upstream kinase activator of both canonical and non-canonical pathways, and its essential for the latter (30). Since we found higher levels of this kinase in the CSCs, we downregulated its expression using two shRNAs. Both shRNAs inhibited the expression of the kinase, as seen



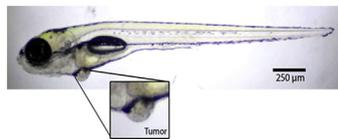
**Figure 3.** Tumor formation capacity. (A) Generation of tumors in immunodeficient mice using SKOV3 cells, isolated tumors and CD44<sup>-</sup> and CD44<sup>+</sup> cells. (B) Tumors volume in immunodeficient mice transplanted with CD44<sup>-</sup> and CD44<sup>+</sup> SKOV3 cells.



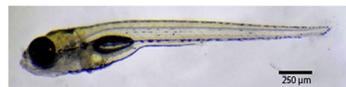
**Figure 4.** Role of the NF- $\kappa$ B canonical pathway in ovarian CSCs. Clonogenicity assays and mammospheres formation tests. (A) Number of colonies of CD44+SKOV3, CD44+SKOV3pLXSN and CD44+SKOV3-IkBαDN cells. (B) Number of mammospheres/60000 cells seeded of CD44+SKOV3-pLXSN and CD44+SKOV3-IkBαDN cells. Error bars represent the SD from three biological replicate with three technical replicates.

by Western Blot analyses (Figure 6A shows one of them). Downregulation of IKK $\alpha$  lead to a decrease in the expression of the stemness gene NANOG in SKOV3 cells (Figure 6B).

**A** 3 Dpi AB Zebrafish embryo, xenotransplanted with 200 SKOV3 pLXSN cells



3 Dpi AB Zebrafish embryo, xenotransplanted with 200 SKOV3 IKBαDN cells



**B**

Treatment	Dilution (cells)	Tumor
SKOV3-pLXSN	50	1/13 = 8%
	100	3/30 = 10%
	200	7/29 = 24%
SKOV3-IkBαDN	50	0/15 = 0%
	100	1/25 = 4%
	200	1/21 = 5%

$p$  value = 0.0188

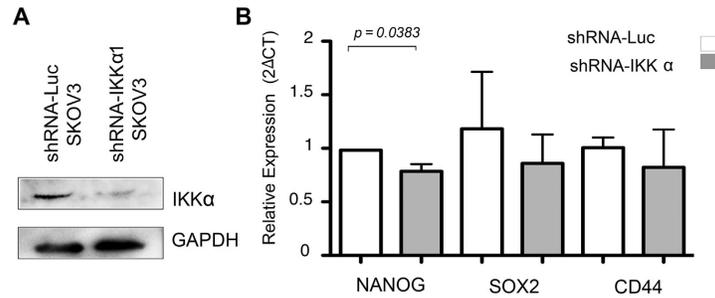
**Figure 5.** Tumor formation in Zebrafish embryos. (A) Representative photograph of tumors in zebrafish by inoculating of CD44+ SKOV3pLXSN and CD44- SKOV3IkBαDN cells. (B) ELDA indicates significant differences between the group ( $p$  value) and percentage of tumor formation.

## Discussion

NF- $\kappa$ B is one of the most important transduction pathways activated in CSCs (21,31–34). In particular, NF- $\kappa$ B canonical pathway is constitutively active in ovarian CSCs from primary tumor cell lines (13–15). In the present report, we isolated ovarian CSCs and measured the levels of several proteins of this cascade. The CD44+ population presented higher levels of RelA and p50, and the stable inhibition of the canonical pathway with a dominant-negative IkB $\alpha$  reduced the ovarian CSC population, the formation of ovospheres, and the colony establishment at low cell dilutions.

We also found a direct correlation between NF- $\kappa$ B activity and CD44 expression. Recently, a novel active NF- $\kappa$ B cis-element in the CD44 gene was reported in breast CSCs (17). In agreement with this, we observed that decreasing the activity of the NF- $\kappa$ B canonical pathway specifically lowered the expression of CD44 and genes involved in the self-renewal and proliferation of CSCs. Previous studies have shown that activation of p50/RelA dimers increased the NANOG promoter activity (11,35) in breast CSCs.

An interesting result obtained in the present report is the observation of higher levels of RelB in the stem subpopulation, which indicates that the non-canonical pathway could be involved in the stem phenotype of ovarian cancer. This was supported by a large expression difference in the levels of the IKK $\alpha$  protein, which is a component of both NF- $\kappa$ B pathways, but essential in the non-canonical cascade. This kinase was overexpressed in CSCs and its inhibition with shRNAs decreased the expression of NANOG, CD44 and Sox2 (Figure 5B). There are reports that indicate the participation of IKK $\alpha$  in the biology of stem cells of ESCs into neuroectoderm and breast CSC (20,21). Our data suggest that both routes of NF- $\kappa$ B are involved in ovarian CSCs.



**Figure 6.** IKK $\alpha$  role in ovarian CSCs. (A) IKK $\alpha$  protein expression levels in shRNA-IKK $\alpha$ 1, or control shRNA-Luc cells. GAPDH was used a loading control for Western blotting. (B) mRNA levels determined by qPCR ( $2^{\Delta\Delta CT}$ ) of two stem genes NANOG, SOX2, and CD44 gene in SKOV3 cells transfected with shRNA-IKK $\alpha$ 2 or shRNA-Luc control. The expression of the constitutive gene TBP was used as a loading control. Error bars represent the SD from one biological replicate with three experimental replicates. The statistical differences are show with the  $p$  value.

### Funding

Carolina Gonzalez-Torres is a doctoral student from the Programa de Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico and received fellowship 175651 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, CONACYT.

### Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.08.001>.

### References

- Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009;9:415–428.
- Weiderpass E, Labreche F. Malignant tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work* 2012;3:166–180.
- Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2010;177:1053–1064.
- Foster LC, Wiesel P, Huggins GS, et al. Role of activating protein-1 and high mobility group-I(Y) protein in the induction of CD44 gene expression by interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2000;14:368–378.
- Seguin L, Gozo M, Weis SM, et al. Targeting the Achilles' heel of drug-resistant cancer stem cells. *Cell Cycle* 2014;13:2017–2018.
- O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010;16:3113–3120.
- Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, et al. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65:3025–3029.
- Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008;68:4311–4320.
- Mor G, Yin G, Chefetz I, et al. Ovarian cancer stem cells and inflammation. *Cancer Biol Ther* 2011;11:708–713.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109(suppl):S81–S96.
- Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, et al. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res* 2010;70:10464–10473.
- Pratt MA, Tibbo E, Robertson SJ, et al. The canonical NF-kappaB pathway is required for formation of luminal mammary neoplasias and is activated in the mammary progenitor population. *Oncogene* 2009;28:2710–2722.
- Alvero AB, Chen R, Fu HH, et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* 2009;8:158–166.
- Leizer AL, Alvero AB, Fu HH, et al. Regulation of inflammation by the NF-kappaB pathway in ovarian cancer stem cells. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:438–447.
- Chefetz I, Alvero AB, Holmberg JC, et al. TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle* 2013;12:511–521.
- Shih VF, Tsui R, Caldwell A, et al. A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 2011;21:86–102.
- Smith SM, Cai L. Cell specific CD44 expression in breast cancer requires the interaction of AP-1 and NFkappaB with a novel cis-element. *PLoS One* 2012;7:e50867.
- Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010;102:206–212.
- Affara NI, Coussens LM. IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis. *Cell* 2007;129:25–26.
- Luningschror P, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Knockdown of IKK1/2 promotes differentiation of mouse embryonic stem cells into neuroectoderm at the expense of mesoderm. *Stem Cell Rev* 2012;8:1098–1108.
- Sun L, Mathews LA, Cabarcas SM, et al. Epigenetic regulation of SOX9 by the NF-kappaB signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. *Stem Cells* 2013;31:1454–1466.
- McAuliffe SM, Morgan SL, Wyant GA, et al. Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2939–E2948.
- Song LL, Peng Y, Yun J, et al. Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene* 2008;27:5833–5844.
- Hao L, Rizzo P, Osipo C, et al. Notch-1 activates estrogen receptor-alpha-dependent transcription via IKKalpha in breast cancer cells. *Oncogene* 2010;29:201–213.
- Singh S, Shi Q, Bailey ST, et al. Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1973–1982.

26. Abubaker K, Latifi A, Luwor R, et al. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Mol Cancer* 2013;12:24.
27. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, et al. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1977;37:3639–3643.
28. Westerfield M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed Eugene: Univ of Oregon Press; 2000.
29. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, et al. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;13:1400–1412.
30. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 2011; 21:71–85.
31. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog—a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16:3130–3140.
32. Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, et al. Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2010;16:3141–3152.
33. Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 2010;16:3153–3162.
34. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 2013;152:25–38.
35. Shostak K, Chariot A. NF-kappaB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res* 2011;13:214.