



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ESTUDIO DEL PAPEL QUE JUEGAN LOS FACTORES INDUCIBLES POR HIPOXIA EN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE TRONCALIDAD CD133 Y CD44v6 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

YENISEY JARDINES FIGUEREDO

TUTOR PRINCIPAL

[Dra. Martha Robles Flores \(UNAM\)](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo \(IIB, UNAM\)](#)

[Dr. Ignacio Camacho Arroyo \(Facultad de Química, UNAM\)](#)

CIUDAD DE MÉXICO, Junio, 2019



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

Resumen	4
Abstract	6
Lista de abreviaturas.....	7
1.Introducción	9
1.1 Epidemiología del CC.....	9
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CC.....	9
1.3 Características del epitelio del colon normal.....	11
1.4 Secuencia adenoma-carcinoma.....	13
1.5 Heterogeneidad tumoral en CC.....	16
1.6 CD133 como marcador de CTC en CC.....	18
1.7CD44 como marcador de CTC en CC.....	20
1.8 CD44v6 como marcador de CTC en CC.....	22
1.9 Efecto de la hipoxia sobre las células cancerosas.....	24
1.10 Metabolismo de las células cancerosas y efecto del estrés nutricional.....	26
2. Objetivo general	28
3. Hipótesis	28
4. Objetivos específicos	29
5. Materiales y métodos	29
5.1 Líneas celulares empleadas.....	29
5.2 Anticuerpos empleados.....	30
5.3 Ensayo de inducción de estrés nutricional.....	31

5.4 Ensayo de inducción de hipoxia.....	31
5.5 Obtención de extractos totales a partir de las células en cultivo y cuantificación de proteínas.....	32
5.6 Electroforesis, Wb y análisis densitométrico.....	32
5.7 Protocolo de transfección para el <i>knockdown</i> de HIF-2 α	33
6. Resultados	34
6.1 Evaluación de la expresión de CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares estudiadas.....	34
6.2 Evaluación de la expresión de los marcadores de troncalidad como respuesta al estrés nutricional.....	35
6.3 Estudio del efecto de la hipoxia y del <i>knockdown</i> de HIF-2 α en la expresión de los marcadores de troncalidad.....	38
6.3.1 Estudio del efecto de la hipoxia en la expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en células de CC.....	39
6.3.2 Estudio del efecto del <i>knockdown</i> para HIF-2 α en la expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en células de CC.....	40
7. Discusión	42
8. Conclusiones	48
9. Perspectivas	48
10. Referencias	49

Resumen

Las células troncales cancerosas se caracterizan, al igual que las células troncales normales del adulto, por su capacidad de autorrenovación y el potencial de dar lugar a células que se diferencien y produzcan progenie especializada. Son las células que portan la capacidad tumorigénica y tienen una gran relevancia clínica al ser responsables de la metástasis, la recurrencia y el fallo de las terapias. Se han encontrado en muchos tipos de cáncer, como el cáncer colorrectal, donde pueden ser aisladas prospectivamente por la expresión de marcadores de troncalidad como CD133 y CD44v6. El comportamiento de esta subpoblación es fuertemente influenciado por el microambiente tumoral, que, en el caso de las neoplasias sólidas, suele contener regiones con una pobre irrigación sanguínea como consecuencia del desarrollo aberrante de la vasculatura y la rápida proliferación, lo que conlleva a la hipoxia (baja disponibilidad de oxígeno) y el estrés nutricional. Se ha demostrado que estas condiciones ambientales vuelven a las células cancerosas más agresivas y promueven el fenotipo troncal. Las respuestas celulares a la hipoxia y el estrés nutricional son mediadas por factores de transcripción inducibles llamados HIFs (factores inducibles por hipoxia, del inglés *Hypoxia-Inducible Factors*), que no sólo promueven la angiogénesis y la reprogramación metabólica celular, sino inducen la expresión de marcadores de troncalidad en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer colorrectal. Teniendo esto en cuenta, en nuestro trabajo tuvimos como objetivo evaluar la expresión de los marcadores de troncalidad CD133 y CD44v6 en células en cultivo de cáncer colorrectal ante diferentes niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-2 α , establecidos mediante estrés nutricional, hipoxia o *knockdown*. Para ello se empezó por analizar la expresión basal de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares 112CoN (colon normal fetal), SW480 (procedente de tumor primario) y SW620 (establecidas de la metástasis derivada del tumor primario de donde se aislaron las SW480). Se observó que las líneas malignas expresan los tres marcadores de troncalidad evaluados, con mayor expresión de CD133 y CD44v6 en la línea metastásica y CD44 en la de tumor primario. Luego se analizó el efecto del estrés nutricional sobre esos marcadores, ya que esa condición ambiental indujo una mayor estabilización de HIF-1 α y se obtuvo un aumento significativo en los marcadores de troncalidad en ambas líneas malignas, lo cual sugiere que ese factor de transcripción puede modular positivamente la expresión de estos marcadores. Posteriormente se mimetizó la hipoxia en los cultivos celulares, lo cual se corroboró con la observación de que ambos HIFs alcanzaron altos niveles de proteína. La hipoxia indujo en ambas líneas malignas un aumento significativo en los niveles de los marcadores de troncalidad evaluados. Nuestros resultados, por tanto, indican que la hipoxia y la privación nutricional promueven la expresión de marcadores de troncalidad en células de cáncer colorrectal. Finalmente nos propusimos estudiar el efecto que ejerce la condición opuesta, que es la disminución de la expresión de HIF-2 α (asociado a la

promoción de la expresión de marcadores de troncalidad), lo que se consiguió mediante el *knockdown* de su gen. Contrario a nuestra hipótesis, el *knockdown* no indujo disminución en la expresión de estos marcadores, lo que podría sugerir que HIF-2 α ejerce una regulación negativa sobre estos marcadores o que, en efecto, promueve su expresión, pero por una señalización más compleja que puede compensar los efectos de este HIF si se ve afectada su expresión.

Palabras clave: cáncer colorrectal, hipoxia, estrés nutricional, células troncales cancerosas

Abstract

Cancer Stem Cells (CSCs) share many properties with normal adult stem cells, like self-renewal and the potency to generate cells that will differentiate and produce specialized progeny. CSCs possess tumor-initiating capacity and are clinically relevant, since they promote metastasis, recurrence and therapy failure. Its existence has been demonstrated in many types of cancer, like colorectal cancer, and can be prospectively isolated by the expression of stemness markers like CD133 and CD44v6. CSCs behavior is tightly influenced by tumor microenvironment, which can contain regions with poor blood supply because of aberrant vascularization and high proliferation. This condition leads to hypoxia (low oxygen tension) and nutrient deprivation, which turn cancer cells more aggressive and promote a stem phenotype. These cellular responses are mediated by transcription factors called Hypoxia Inducible Factors (HIFs), which promote angiogenesis, metabolic reprogramming and induce the expression of stem cell markers in many types of cancer, including colorectal cancer. Taking all this into account, we decided to evaluate the expression of CSCs markers CD133 and CD44v6 in colorectal cancer cell cultures exposed to different levels of HIF-1 α and HIF-2 α , which were established by means of nutrient deprivation, hypoxia or genetic knockdown. We first analyzed the basal expression of the stem cell markers CD133, CD44 and CD44v6 in the cell lines 112CoN (fetal normal colon), SW480 (from a primary colorectal tumor) and SW620 (established from the metastatic lesion originated from the tumor where SW480 were isolated from). It was observed that both malignant cell lines express the three markers, with higher expression of CD133 and CD44v6 in the metastatic cell line compared to the primary tumor cell line, which expresses more CD44. We then analyzed the effect that nutritional stress exerts on these markers' expression, since this condition induced an increased HIF-1 α stabilization. In general, the stem cell markers increased their expression as a consequence of nutrient deprivation, so this suggests that HIF-1 α might exert a positive regulation on these CSC markers. Then, we mimicked hypoxia, which was corroborated because both HIFs were stabilized and reached higher levels. Under this condition there was registered a significant increase in the expression of the CSC markers. Our results suggest that both hypoxia and nutrient deprivation promote the expression of CSC markers in colorectal cancer cells. We finally intended to analyze the effect of a decrease in HIF-2 α expression (knockdown), because of its previously reported role in promoting the expression of CSC markers. Contrary to our hypothesis, there was no decrease in CSC markers protein levels induced by HIF-2 α knockdown. This might suggest this HIF exerts a negative regulation on CD133, CD44 and CD44v6 expression or that its effect depends on a more complex signaling pathway, which could offset its decrease.

Lista de abreviaturas:

5-FU: 5-Fluorouracilo

Akt: también llamada Proteína Cinasa B, es una Ser/Thr cinasa.

ALDH1: Aldehído-deshidrogenasa 1

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ARNT (HIF-1 β): translocador del receptor nuclear Ah, del inglés *Aryl-Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

BMPs: proteína morfogénica ósea, del inglés *Bone Morphogenic Protein*

CC: cáncer colorrectal

CK1: caseína-cinasa 1

CT: células troncales

CTC: células troncales cancerosas

EGF: factor de crecimiento epitelial, del inglés *Epithelial Growth Factor*

EpCAM: molécula de adhesión epitelial, del inglés *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

GAPDH: del inglés *Gliceraldehído- Phosphate Dehydrogenase*

GSK-3 β : glicógeno sintasa-cinasa 3 β

HGF: factor de crecimiento hepático, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*

HIFs: factores inducibles por hipoxia, del inglés *Hypoxia-Inducible Factors*

HRE: elemento de respuesta a hipoxia, del inglés *Hypoxia Response Element*

IL-6: Interleucina-6

Lgr5: receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina, del inglés *Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5*

LRP5/6: proteína 5/6 relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad, del inglés *Low density lipoprotein Recetor-related Protein 5/6*

MAPK: proteínas cinasas asociadas a mitógenos, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MDR1: gen de multiresistencia a drogas, del inglés *Multiple Drug Resistance*

MMP: metaloproteinasas de matriz, del inglés *Matrix Metalloproteinase*

Msi-1: Musashi-1

mTOR: del inglés *mammalian Target of Rapamycin*

Oct4: factor de transcripción 4 de unión a octámero, del inglés *Octamer-binding transcription factor 4*

OPN: Osteopontina

PAS: proviene de tres proteínas en que se encuentra ese dominio: Per, Arnt, Sim

PFK1: fosfofructocinasa 1, del inglés *Phosphofructokinase 1*

PI3K: fosfoinositol 3-cinasa, del inglés *Phosphoinositol 3-Kinase*

pVHL: proteína Von-Hippel Lindau

SDF-1: factor 1 derivado del estroma, del inglés *Stromal-cell Derived Factor 1*

SDS-PAGE: electroforesis con dodecilsulfato sódico en gel de poliacrilamida, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

Sox2: del inglés *(Sex determining region)-box2*

STAT3: proteína 3 transductora de señal y activadora de la transcripción, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TGF- β : Factor Transformante- β , del inglés *Transforming Growth Factor- β*

1 Introducción

1.1 Epidemiología del CC.

Según los datos publicados en el 2018 por la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer en la plataforma de GLOBOCAN (<http://gco.iarc.fr/>), el CC ocupa el tercer lugar en incidencia y el segundo lugar en mortalidad por cáncer a nivel global, superado en letalidad sólo por el cáncer de pulmón. En 2018 se estimó un número de 1 849 518 de nuevos casos y 880 792 muertes por esta enfermedad en todo el mundo. Este tipo de neoplasia representa, por tanto, el 10.2% de todos los nuevos casos de cáncer estimados en ese año, así como el 9.2% de todas las muertes estimadas por cáncer en ese período.

México refleja estas estadísticas, siendo el CC también el tercero en cuanto a incidencia (superado por el cáncer de mama y el de próstata) y llegando a causar unas 700 000 defunciones al año. En el transcurso del 2018 se estimaron 10 457 nuevos casos y cerca de 5 700 muertes a causa de esta malignidad en el país (GLOBOCAN, 2018). Las proyecciones de muertes por neoplasias a nivel global son alarmantes, indicando que hacia 2030 la mortalidad aumentará de 8 millones a 11.5 millones (Siegel et al., 2015). La magnitud de los efectos del cáncer, en general, no es muy diferente en México con respecto al panorama mundial. Desde la década de 1960 el cáncer se posicionó entre las principales causas de defunciones en este país y desde 2014 es la tercera, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

Según datos ofrecidos por la Secretaría de Salud, de entre todos los tipos de cáncer, el colorrectal ha aumentado su incidencia en la población mexicana, a tal punto que hace 10 años no se encontraba dentro de las principales causas de neoplasia maligna en México y ahora ha alcanzado ese nivel, aumentando su incidencia incluso en personas menores a 40 años, que no suelen constituir el grupo etario más afectado (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

Los datos más recientes con los que se cuenta son los publicados por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI) en 2015. Existe una clara escasez de información actualizada y accesible con respecto a las estadísticas del cáncer en México. El control de este tipo de enfermedades requiere un esfuerzo integral. Es por lo que, en México, deberá empezar por una mejora en el sistema de información en salud, así como la creación de registros hospitalarios e interinstitucionales para concretar un registro nacional de cáncer (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CC.

El CC es el cáncer más común del tracto gastrointestinal. Su etiología es compleja pues incluye la interrelación de factores ambientales y genéticos (Jeon et al., 2018). De hecho, se ha determinado que los individuos que migran de zonas de baja incidencia para CC a zonas de alta incidencia, con el tiempo desarrollarán el mismo

riesgo que los individuos nativos de esas áreas (Rodríguez et al., 2003). La gran mayoría de los casos de CC (alrededor del 95 %) se consideran esporádicos, es decir que las modificaciones genéticas se desarrollan al azar en las células somáticas. Los casos de CC hereditarios son menos frecuentes (alrededor del 5 %) y ocurren cuando las mutaciones o modificaciones genéticas se transmiten dentro de una familia, de generación a generación (Guinney et al., 2015). No se conocen causas específicas, pero entre los factores de riesgos mejor caracterizados para este tipo de neoplasia, se encuentran: la edad (mayor a 50 años), los antecedentes familiares de CC, afecciones hereditarias que predisponen al desarrollo de síndromes relacionados con este tipo de cáncer, la presencia de una enfermedad inflamatoria intestinal persistente, el sedentarismo, la obesidad, el tabaquismo, la ingesta excesiva de alcohol, una mala nutrición y de manera muy importante: la presencia de pólipos adenomatosos en el colon (Jeon et al., 2018).

Se ha demostrado que la ingesta rica en lípidos insaturados de origen animal aumenta el riesgo de desarrollarlo. Así mismo lo hace la ingesta excesiva de carnes rojas, especialmente preparada a altas temperaturas. Sin embargo, un consumo periódico y adecuado de frutas, vegetales, vitaminas y fibra tienen un efecto protector (Jemal et al., 2010). El efecto perjudicial de la carne puede deberse al propio proceso de la cocción, la presencia de nitritos y nitratos en muchas carnes procesadas, que, al metabolizarse rinden compuestos nitrogenados que actúan desestabilizando el ADN (Siegel et al., 2015). Con respecto al alcohol y el tabaco, se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar CC, ya que aumentan el riesgo de formación de adenomas, que son las lesiones típicas precursoras para este tipo de neoplasias. Además, el etanol se metaboliza vía oxidación hasta acetaldehído y este metabolismo produce estrés oxidativo, lo cual incrementa el riesgo de daño al ADN (Siegel et al., 2015).

Por otra parte, se ha descubierto que los analgésicos no esteroideos se asocian con una disminución en el riesgo de CC. Estudios concluyen que el uso de algunos medicamentos de este tipo, como el sulindac y celecoxib, favorecen la disminución del número y tamaño de los adenomas en la poliposis adenomatosa familiar e incluso pueden provocar la regresión de las lesiones. La aspirina también ha demostrado tener un efecto protector para pacientes de alto riesgo. (Steinbach et al., 2000; Flossmann et al., 2007).

Los factores genéticos también se cuentan entre los principales factores de riesgo, como se mencionó. La existencia de antecedentes familiares de CC confieren un riesgo mayor, duplicándolo si se trata de un familiar de primer grado (Rodríguez et al., 2003). Esto se debe a que la persona tendrá mayor probabilidad de desarrollar pólipos adenomatosos. La predisposición hereditaria se relaciona con la presencia de polimorfismos en proteínas, de los cuales, el más conocido, es el del gen *APC* (De la Chapelle, 2004). Existen varios síndromes familiares relacionados con el CC, como el de Poliposis Adenomatosa Familiar, el CC no Polipósico Hereditario, Síndrome de Poliposis Juvenil, etc. Se caracterizan por la aparición temprana de un gran número de pólipos que rápidamente progresan a cáncer. De ahí que sea necesario que, las personas que las padecen se realicen colonoscopías desde la niñez (Read y Kodner, 1999). Por último, la enfermedad inflamatoria del intestino también aumenta el riesgo de CC, el cual se acrecienta en un 8% después de 20 años y a 18% después de 30 años de padecerla (Wirtzfeld et al., 2001).

1.3 Características del epitelio del colon normal.

El epitelio intestinal es la superficie mucosa más extensa de nuestro organismo y el tejido que exhibe la mayor tasa de proliferación, pudiendo llegar a recambiarse en una semana (Barker et al., 2007) Se encuentra organizado formando invaginaciones llamadas “criptas”, las cuales constituyen la unidad funcional básica de la mucosa colorrectal (Clevers et al., 2013). En el fondo de las criptas residen las CT intestinales, que se caracterizan por su capacidad de autorenovación y la potencialidad de generar células que se diferencien y den lugar a células maduras epiteliales. Las CT intestinales se encuentran en continua división y mantienen la homeostasis de ese tejido. El primer reporte que demostró la existencia de CT intestinales, fue publicado por Barker et al. (2007), quienes identificaron a Lgr5 como marcador de este tipo de células. Observaron que las células Lgr5(+) son capaces de autorenovarse, además, mediante rastreo de linaje los autores demostraron que también poseen la capacidad de generar todos los linajes diferenciados que pueblan la cripta intestinal, tanto de intestino delgado como del colon, formando clones que emanaban desde el fondo de la cripta y hacia arriba. Otros marcadores que han sido propuestos para la identificación de las CT intestinales son ALDH1, CD29, Msi-1, etc (Vaiopoulos et al., 2012).

Las CT del intestino generan amplificadores de tránsito que rápidamente proliferan y finalmente dan lugar a las células epiteliales especializadas. Luego estas células son empujadas hacia afuera de la cripta, hacia la luz intestinal por la siguiente generación. Cada cripta contiene aproximadamente 6 CT intercaladas con células caliciformes en el colon, y con células de Paneth en el intestino delgado, que son esenciales para el mantenimiento de la troncalidad al secretar las señales necesarias para la autorenovación y multipotencialidad. A pesar de la visión clásica de las CT como entidades quiescentes, las del intestino se dividen cada día (Barker et al., 2007). Las células amplificadoras de tránsito se dividen a su vez cada 12-16 h, generando unas 300 células por cripta diariamente, que residen allí durante 48 h mientras llevan a cabo hasta cinco rondas de división celular y van migrando hacia arriba, comprometiéndose progresivamente hacia alguno de los linajes que pueblan el epitelio intestinal. Las células de Paneth, como excepción, son las únicas que migran hacia abajo (Marshman et al., 2002).

El esquema del intestino a nivel de las criptas funciona para aislar a las células en activa proliferación y exponer a los daños del tracto digestivo sólo las células postmitóticas. El intestino combina de manera sumamente eficiente las ventajas absortivas de un epitelio de una sola capa y de amplia superficie, con la protección de una barrera en constante renovación (Zeuner et al., 2014). De modo que, este complejo sistema, es altamente dependiente de un abastecimiento constante de todos los tipos celulares que lo componen, en las proporciones adecuadas.

Para proteger a las CT del agresivo ambiente intestinal, existen mecanismos que promueven la proliferación y minimizan el daño a esta subpoblación. La cripta está conectada al lumen intestinal solamente por una apertura pequeña de unos 6 μm , lo cual limita la difusión, evitando la entrada de productos microbianos, como toxinas. Además, cerca de la apertura de la cripta, las células caliciformes secretan moco que crea una barrera física. Incluso se ha descrito una subpoblación de células centinelas ubicadas a la entrada de la cripta, que continuamente “vigilan”

sus alrededores mediante endocitosis. Al detectar invasión bacteriana promueven una respuesta coordinada de otras células caliciformes que producen mayor cantidad de moco, facilitando la expulsión del agente extraño (Gehart y Clevers, 2018).

Existen dos gradientes de señalización en sentido opuesto dentro de las criptas, que regulan la homeostasis a nivel de estas unidades funcionales: el de vía Wnt y el de BMPs. En el fondo los ligandos Wnt y sus potenciadores, las R-spondinas, son secretados por las células mesenquimales y epiteliales que rodean a las CT, lo cual induce una fuerte actividad Wnt (Carmon et al., 2011). Debido a la pobre solubilidad de los ligandos Wnt, la transferencia de señal ocurre por contactos célula-célula, lo cual crea un gradiente de disponibilidad de esos ligandos, que disminuyen su actividad a medida que la célula se aleja del fondo de la cripta. Mientras tanto, existe un gradiente de actividad BMP que va en aumento en la dirección opuesta al de Wnt, hacia arriba. Las células que residen entre las criptas, en la luz intestinal, secretan BMPs que inducen la maduración de las células que van en ascenso (Battle y Clevers, 2017). Para proteger al compartimiento troncal de esta señal de diferenciación, los miofibroblastos y células musculares que rodean el fondo de la cripta secretan proteínas inhibitoras de BMPs (Gehart y Clevers, 2018). Una vez que las células son empujadas hacia afuera del nicho, empiezan a diferenciarse. La señalización por TGF- β es otro elemento fundamental en la regulación de la homeostasis a nivel de la cripta. Es inhibidor de la proliferación del epitelio intestinal normal e inductor de apoptosis (Zhang et al., 2010). La señalización Notch, por su parte, determina si las nuevas células se comprometen hacia el linaje encargado de la absorción o de la secreción. El linaje de absorción está representado por los enterocitos. El linaje secretor comprende a las células enteroendocrinas, las células del nicho secretoras de factores necesarios para el mantenimiento y proliferación de las CT (células de Paneth en intestino delgado, y algunas caliciformes en intestino grueso), las células secretoras de moco (caliciformes) y las células implicadas en la defensa antimicrobiana (Ritsma et al., 2014).

A pesar de que las CT pueden llevar a cabo divisiones simétricas o asimétricas, Gehart y Clevers (2018) afirman que las divisiones celulares en el fondo de la cripta son siempre simétricas, lo cual significa que ambas células hijas tienen igual oportunidad para permanecer en el nicho y retener así su estatus troncal. Afirman que el limitado espacio del nicho es lo que crea una competencia entre clones con igual potencial (competición neutral), que lleva a la pérdida o dominancia de alguno en el tiempo. Como la oportunidad de un clon para dominar depende de su habilidad para proliferar rápidamente, aquellas CT que porten mutaciones que afecten la proliferación, como mutaciones oncogénicas que produzcan retraso en la segregación de cromosomas, estarán en desventaja y son desplazadas eventualmente del fondo de la cripta. Por tanto, para que surja un tumor en el intestino, las células iniciadoras deben adquirir la capacidad de proliferar fuera del nicho troncal antes de ser empujadas hacia afuera de éste. Como las células mutadas estarán compitiendo con células normales altamente proliferativas por un espacio limitado, sólo las mutaciones que provean independencia del nicho les permitirán dividirse rápidamente fuera de éste y dar inicio a un tumor (Gehart y Clevers, 2018).

1.4 Secuencia adenoma-carcinoma.

A diferencia del avance más bien modesto que ha tenido lugar con respecto a la identificación de los factores de riesgo ambientales y de estilo de vida que contribuyen al desarrollo del CC, ha habido un progreso significativo en el descubrimiento de las alteraciones genéticas específicas que promueven la predisposición a este tipo de cáncer (Fearon, 2011). Los defectos moleculares que se han identificado en el CC se circunscriben a alteraciones que activan la función de oncogenes y aquellas que llevan a la pérdida de función de genes supresores de tumores.

Con respecto a las lesiones que se dan en el intestino, las que se proyectan por encima de la mucosa circundante, se llaman pólipos. En humanos, la mayoría de los pólipos colorrectales pequeños (menores a 5 mm de diámetro) son hiperplásicos y no son precursores de cáncer. La evidencia clínica indica que son los pólipos adenomatosos, o adenomas, las lesiones precursoras del cáncer intestinal, los cuales se caracterizan por una morfología displásica y diferenciación alterada (Slattery y Fitzpatrick, 2009).

La progresión tumoral en el CC se describe con la secuencia adenoma-carcinoma, que es un modelo en el cual se transcurre por estados consecutivos desde tejido normal a estados preinvasivos, y en última instancia a carcinoma invasivo con la capacidad de metástasis (Drost et.al, 2015). Este modelo fue propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990. Los autores estudiaron los datos clínicos e histopatológicos con que se contaba hasta ese momento para este tipo de neoplasia y llegaron a valiosas observaciones, como que: i) se requieren mutaciones en, al menos, cuatro o cinco genes para la formación de un tumor maligno en el colon. Menor número de mutaciones promueven tumores benignos; ii) aunque las mutaciones suelen suceder en una secuencia “preferida”, es la acumulación de alteraciones y no el orden con respecto a las demás, lo que determina las propiedades biológicas de un tumor. Finalmente diseñaron el modelo de progresión que inicia con la formación de pólipos benignos, caracterizados por la activación constitutiva de la vía de señalización Wnt, lo cual ocurre mayormente por mutación inactivadora en *APC*. Luego la progresión parece ocurrir por mutaciones consecutivas en el gen de *KRAS*, *p53* y en proteínas *SMAD*, que van volviendo a la lesión más maligna y con mayor capacidad de hacer metástasis (Fearon y Vogelstein, 1990). Este esquema se basa en la observación de que, cada alteración genética ocurre con mayor frecuencia en un estadio particular del desarrollo tumoral (Drost et.al, 2015).

Estudios posteriores han apoyado a este modelo. Li et al. (2014) demostraron que la desregulación de *APC*, *P53*, *KRAS* y *SMAD4* es suficiente para transformar células de colon de ratón en cultivo y dar lugar a tumores con histología similar a adenocarcinoma. Como otro ejemplo, en el trabajo publicado por Drost et.al (2015) obtuvieron cultivos de organoides derivados de intestino delgado humano. Mediante edición genética introdujeron de manera secuencial cuatro de las mutaciones más comunes observadas en tumores de CC en humanos, que fueron precisamente en los genes *APC*, *P53*, *KRAS* y *SMAD4*. Observaron que los organoides de intestino

delgado portadores de las cuatro mutaciones crecieron como tumores con características de carcinoma invasivo *in vivo*, así como aneuploidía. Mientras tanto, *in vitro*, las mutantes triples y cuádruples exhibieron una alta proliferación, aunque sólo los cultivos con todas las mutaciones crecieron como masas sólidas de tumor. Finalmente introdujeron tres o las cuatro mutaciones en un cultivo de organoides de colon humano y observaron los mismos resultados. Las mutantes triples formaron quistes con características locales de carcinoma bien diferenciado y limitada invasividad. Las mutantes cuádruples, por su parte, exhibieron una pobre diferenciación y mayor capacidad invasiva del tejido muscular circundante cuando se xenotrasplantaron a ratones. Además, mostraron aneuploidía y proliferación independiente de factores de crecimiento, lo cual se traduciría como independencia de los factores del nicho. Esta última característica ha sido postulada como un requerimiento importante para la progresión del CC y la adquisición de capacidad metastásica (Gehart y Clevers, 2018).

La mutación en *APC* se encuentra en más del 90% de los casos de poliposis familiar adenomatosa y otros síndromes hereditarios relacionados con el CC. Pero esta mutación juega un papel también muy destacado en el CC esporádico, donde se ha reportado en aproximadamente el 70-80% de los pacientes (Fearon, 2011). Casi todas las mutaciones de ese gen producen versiones truncadas de la proteína, impidiendo que se forme el complejo de destrucción de la β -catenina. La evidencia sugiere que las mutaciones en *APC* son un evento muy temprano y fundamental en el desarrollo de la mayoría de los adenomas. Primero, porque estas mutaciones tienen la misma frecuencia en adenomas muy pequeños, en adenomas grandes y en carcinomas (Polakis, 2007). Además, estas alteraciones genéticas se encuentran incluso en las lesiones más pequeñas y tempranas, como adenomas microscópicos compuestos de unas pocas células displásicas (Kinzler y Vogelstein, 1996).

El gen supresor de tumores *APC* codifica una proteína que regula la adhesión célula-célula, la migración celular, segregación de cromosomas y apoptosis en la cripta del colon (Aoki y Taketo, 2007). La restauración de su expresión en células de CC que carecen de *APC* promueve apoptosis. Aunque tiene múltiples funciones, la mejor establecida en el contexto del cáncer es la de controlar la estabilidad de la β -catenina en la vía canónica de señalización Wnt (Polakis, 2007). En ausencia de ligando Wnt, *APC* se halla formando un complejo con las proteínas Axina, CK1 y GSK-3 β , promoviendo la fosforilación de varios residuos conservados de Ser/Thr en la porción N'-terminal de la β -catenina, lo cual la marca para poliubiquitinación y posterior degradación proteosomal. En presencia de ligandos Wnt, éstos se unen a su complejo receptor formado por la proteína Frizzled y LRP5/6, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el complejo destructor de β -catenina. La β -catenina estabilizada en citoplasma, se transloca a núcleo y funciona como coactivador transcripcional sobre la expresión de genes implicados en la supervivencia y proliferación (Brocardo, 2009).

Otra de las mutaciones implicadas en el modelo adenoma-carcinoma desde el primer estudio por Fearon y Vogelstein (1990), es en *KRAS*, que se encuentra mutado en cerca del 40% de los casos de CC. Esta mutación contribuye al desarrollo de adenomas, pero no se requiere para la iniciación. Se suele encontrar en focos de criptas aberrantes, que forman lesiones planas con arquitectura

alterada, pero sin displasia (Pretlow y Pretlow, 2005). También está presente en la mayoría de los pólipos hiperplásicos, que no suelen progresar a carcinoma. En los adenomas, la frecuencia de esta mutación depende claramente del tamaño y el grado de displasia de la lesión. Sólo un 10% de los adenomas menores a 1 mm muestran mutación en *KRAS*, mientras que ésta se encuentra en cerca del 50% de los adenomas mayores a 1 cm (Chan et al., 2003).

Las Ras son proteínas G pequeñas con actividad GTPasa que funcionan como transductoras de señal corriente abajo de varios receptores con función tirosina-cinasa, como el receptor de EGF (EGFR). Además, las proteínas Ras activan cascadas de señalización como la de MAPK y PI3K, que promueven proliferación y supervivencia. La mutación activadora de estos interruptores moleculares conduce a la activación constitutiva desregulada de estas vías y, consecuentemente, al cáncer (Rajagopalan et al., 2002). En el caso de *KRAS* mutado, parece ser importante en la transición de adenoma temprano a adenoma intermedio o tardío, o sea, con mayor grado de displasia y a las puertas de dar lugar a un carcinoma (Fearon y Vogelstein, 1990).

Otra de las alteraciones genéticas halladas con mayor frecuencia en CC es la pérdida de heterocigocidad (pérdida de una de las copias de un determinado gen), la cual, se cree, es un mecanismo para inactivar un alelo de algunos genes supresores de tumores (Fearon, 2011). Aproximadamente un 70% de los casos de CC muestran pérdida de heterocigocidad del cromosoma 17, donde se encuentra el gen *P53* y en muchos de estos casos el alelo restante lleva alguna mutación somática. Como la mayoría de los adenomas carecen de pérdida de heterocigocidad del cromosoma 17 o incluso de mutación en *P53*, estas alteraciones específicas parecen estar fuertemente asociadas a la transición de adenoma a carcinoma. Dado el papel de esta proteína (p53), como regulador transcripcional de genes que codifican funciones en el control del ciclo celular, promotores de apoptosis y restricción de angiogénesis, su mutación facilitaría la proliferación continua desregulada y la adquisición de capacidad de invasividad que resultan útiles para las células cancerosas cuando se enfrentan al estrés por parte del microambiente (Vousden y Prives, 2009).

También se ha encontrado pérdida de heterocigocidad en el cromosoma 18, donde se hallan los genes *SMAD2* y *SMAD4*. Esta alteración cromosómica se ha observado en cerca del 70% de los casos de CC, en el 50% de los adenomas tardíos de mayor tamaño y en menos del 10% de los adenomas pequeños tempranos (Harradine y Akhurts, 2006). *SMAD2* funciona corriente abajo del complejo receptor de TGF- β y depende de fosforilación para activarse y translocarse al núcleo. Allí se une a *SMAD4*, formando un complejo que se puede unir a secuencias específicas y regular la transcripción de genes. La señalización por TGF- β tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, siendo una vía fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio del colon. Esta señal se encuentra activa en la mitad superior de la cripta intestinal, inhibiendo las características de troncalidad y favoreciendo la diferenciación (Drost et al., 2015). La pérdida de la función de *SAMD2/4*, eliminaría este efecto inhibitorio, promoviendo la proliferación aberrante.

1.5 Heterogeneidad tumoral en CC.

Desde el siglo XIX se notó que existe heterogeneidad en la morfología celular de los tumores y desde los años 1970's, se ha descubierto que esa heterogeneidad también se evidencia en los marcadores de superficie de las células malignas, las mutaciones, las tasas de proliferación y la respuesta a terapias (Kreso y Dick, 2014). No sólo existe variación entre tumores procedentes de diferentes pacientes (heterogeneidad intertumoral), sino que se ha observado que hay poblaciones con diferencias fenotípicas y funcionales incluso dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral) (De Sousa E Melo et al., 2013a).

Existen dos modelos que intentan explicar la heterogeneidad celular observada en los diferentes tipos de cáncer. El Modelo Estocástico o de expansión clonal, postula que la heterogeneidad surge de poblaciones biológicamente equivalentes, como producto de la selección y expansión de clones con ventajas de crecimiento. Una primera mutación produciría el crecimiento de una lesión benigna genéticamente homogénea. Más mutaciones se pueden ir sucediendo, promoviendo que surjan subclones más agresivos que van siendo seleccionados, hasta que el tumor en su totalidad esté compuesto por células con características de troncalidad. Este modelo asume que cualquier célula dentro de un tumor podría formar un nuevo tumor si se llega a encontrar en las condiciones adecuadas y la capacidad tumorigénica no puede ser aislada ni enriquecida (Clevers, 2011).

Por su parte, el Modelo Jerárquico propone que la heterogeneidad surge de poblaciones diferentes, fenotípica y funcionalmente, dentro de un tumor, donde las CTC son las únicas con el potencial de dar lugar a un nuevo tumor. Afirma que una minoría de células malignas, con potencial proliferativo indefinido, capacidad de autorenovación, de división asimétrica y potencial de diferenciarse a varios linajes celulares, son las que pueden iniciar un nuevo tumor, mientras que la gran mayoría de las células no cuentan con estas capacidades. Por tanto, si se cumple este modelo, la capacidad tumorigénica debe poder ser aislada prospectivamente (Clevers, 2011; Kreso y Dick, 2014). Según la teoría de las CTC, los tumores no deben verse como expansiones clonales de células transformadas, sino más bien como tejidos complejos donde el crecimiento es impulsado por esa minoría. Esta hipótesis ha sido apoyada por tres importantes observaciones experimentales, primero en leucemia mieloide aguda y luego extendidas a tumores sólidos: i) solamente una minoría de las células de un cáncer tienen potencial tumorigénico cuando se trasplantan a ratones inmunodeficientes, ii) esas células tumorigénicas pueden ser aisladas de manera reproducible en virtud de diferencias fenotípicas con respecto a las células no tumorigénicas (marcadores) y iii) los tumores que surgen de estas células con capacidad iniciadora de tumor, contienen una mezcla de células tumorigénicas y no tumorigénicas, recreando así la heterogeneidad fenotípica del tumor original (Dalerba et al., 2007).

Con respecto al origen de las CTC, existen dos posibilidades: que surjan a partir de células troncales normales que hayan acumulado mutaciones o por desdiferenciación de células maduras. No obstante, la ausencia de un marcador

específico de CTC y la plasticidad fenotípica que exhiben complica mucho el lograr dilucidar este aspecto (Kreso y Dick, 2014; Zeuner et al., 2014).

Uno de los hitos en el campo de las CT lo marcó el estudio realizado por Till y McCulloch, quienes desarrollaron un ensayo de repoblación clonal *in vivo* y demostraron que una única célula hematopoyética poseía potencial de autorenovación y de dar lugar a todos los linajes celulares de la sangre (Till y McCulloch, 1961). Treinta años después el grupo de John Dick demostró la existencia de las CT hematopoyéticas en leucemia mieloide aguda humana evaluando la expresión diferencial de dos marcadores de superficie. Encontraron que la fracción CD34(+)/CD38(-) podía establecer y mantener la leucemia en un modelo murino (Dick et al., 1991). De este modo se logró aislar a la subpoblación troncal por primera vez en un cáncer.

En 2003, Al-Hajj demostró lo mismo para un tumor sólido (cáncer de mama), encontrando enriquecida la capacidad iniciadora de tumor en la fracción celular CD44(+)/CD24(-) (Al-Hajj et al., 2003). En los años posteriores se ha ido demostrando la existencia de CTC en otros tumores sólidos, como de cerebro (Singh et al., 2004), páncreas (Hermann et al., 2007), pulmón (Eramo et al., 2008), próstata (Collins et al., 2005), sarcoma (Wu et al., 2007) y colon (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Todos estos estudios indican que la habilidad tumorigénica varía entre diferentes células de un mismo tumor, además postulan que estas diferencias se deben a la existencia de una jerarquía entre células tumorigénicas y no tumorigénicas. Dicha jerarquía es comparable a la que existe durante el desarrollo de tejidos normales, donde las CT residen en la punta superior y son responsables de generar a toda la progenie, la cual, en cambio, exhibe un compromiso creciente y restricción de linaje (Kreso y Dick, 2014). Cabe destacar que, aunque la expresión diferencial de marcadores de superficie celular es el medio para el aislamiento prospectivo de las CTC, esta no es la única causa de la heterogeneidad funcional que se observa entre las subpoblaciones celulares. También influye el trasfondo genético y epigenético, así como el microambiente tumoral (Dalerba et al., 2011).

En el caso del intestino, el estudio realizado por Barker et al. (2007) demostró por primera vez la existencia de CT en este tejido. Como la señalización Wnt es la que controla la biología de la cripta, los autores hipotetizaron que algún gen blanco de esta vía debía expresarse específicamente en las CT del tejido. De entre 80 genes elegidos *LGR5* se expresaba de una manera única. Se comportaba como blanco de Wnt y se expresaba en la base de la cripta. Mediante rastreo de linaje observaron que las células Lgr5(+) se mantuvieron por un plazo de 60 días y poblaron toda la cripta, emanando desde el fondo hacia arriba. Similares resultados se observaron en intestino delgado y en colon de ratones. Por tanto, este es el primer reporte de la existencia de CT en intestino normal, con el marcador Lgr5.

En ese mismo año se publicaron dos estudios simultáneamente que, en su caso, reportaron el aislamiento de CT a partir de muestras de CC. O'Brien et al. (2007) y Ricci-Vitiani et al. (2007), mencionados anteriormente, identificaron una subpoblación de CTC de colon a partir de la expresión diferencial del marcador CD133. Poco después, Dalerba et al. (2007) demostraron que las células tumorigénicas de este tipo de cáncer también se pueden enriquecer al evaluar el marcador CD44. De esta manera, aunque el modelo de progresión propuesto por

Fearon y Vogelstein en 1990 apoya un mecanismo de expansión clonal en el CC, con la identificación de CT en este tipo de neoplasias se añadió complejidad a su estudio, ya que la mayoría de la evidencia apunta a un modelo jerárquico de desarrollo tumoral.

1.6 CD133 como marcador de CTC en CC.

CD133, también llamado Prominina-1, es una proteína de 865 aminoácidos, con cinco dominios transmembranales y dos lazos extracelulares glicosilados. Su talla es de 97 kDa, pero la molécula glicosilada alcanza los 120 kDa (Yin et al., 1997). El gen que la codifica, llamado *PROM1*, está altamente conservado en el reino animal. En humanos se expresa en varios tejidos epiteliales del adulto, así como en CT y progenitores del sistema hematopoyético (Miraglia et al., 1997). La transcripción de CD133 está regulada por cinco promotores alternativos, específicos de tejido, lo cual resulta en variantes de *splicing* con diferente dominio C-terminal citoplasmático. (Fargeas et al., 2004). Su función no ha sido dilucidada, pero se cree que está implicada en la organización de la membrana plasmática en tejidos epiteliales. Se describió por primera vez en CT del sistema hematopoyético y en progenitores tempranos en médula ósea, pero luego se ha empleado para el aislamiento de CT en muchos otros tejidos, ya sea sola o en combinación con otros marcadores (Wu y Wu, 2009; Sahlberg et al., 2014).

En el estudio de Uchida et al. (2000) se aislaron células individuales con fenotipo CD133(+)/CD34(-)/CD45(-) a partir de tejido fresco de cerebro fetal, las cuales originan neuroesferas en cultivo, que pueden diferenciarse a neuronas y células de la glía, además de exhibir potencial de autorenovación, lo cual sugiere que CD133 es un marcador de troncalidad en ese tejido (Uchida et al., 2000). En tejidos adultos de próstata humana CD133 se encontró expresándose exclusivamente en las células con mayor nivel de expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$, que es un marcador de troncalidad del epitelio de este órgano. Las células CD133(+) exhibieron un alto potencial proliferativo *in vitro* y al trasplantarlas a ratones inmunodeficientes, reconstituyeron estructuras típicas de la próstata, no así las CD133(-), lo cual sugiere que se trata de un marcador de CT normales de próstata (Shepherd et al., 2008). En estómago, duodeno y colon también se ha observado que las células de la base de las criptas expresan CD133 en su superficie apical y se ha propuesto como marcador de troncalidad en esos tejidos (Wu y Wu, 2009). Por tanto, CD133 se ha propuesto como marcador de troncalidad en muchos tejidos, como el colorrectal.

Esta proteína también ha demostrado ser un potente marcador para la identificación de CT en cáncer, hallándose expresada en tumores de mama, próstata, glioma, hígado, pulmón, ovario y colon (Kym y Ryu, 2017). De hecho, cuando se reportó por primera vez el aislamiento de CT de CC, en 2007, se empleó a CD133 como marcador para el aislamiento prospectivo de las células tumorigénicas (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). En el estudio de

O'Brien et.al, se desarrolló un modelo de xenotrasplante en cápsula renal de ratones inmunodeficientes a partir de tumores colorrectales humanos. Basándose en la información existente con respecto a la expresión de CD133 en otros tumores, estos autores hipotetizaron que las CTC podrían ser CD133(+). Al evaluar la tumorigenicidad de las subpoblaciones CD133(-) y CD133(+), observaron que 1 de 47 ratones desarrolló tumor con la mayor dosis empleada de células CD133(-), que fue del orden de 10^5 . Mientras tanto, con solo 100 células CD133(+) se formó tumor en 1 de cada 4 ratones. Además, por ensayos de dilución limitante, observaron que había 1 célula iniciadora de tumor colorectal por cada $5,7 \times 10^4$ células no fraccionadas, mientras que había 1 por cada 262 células CD133(+), lo cual representa un enriquecimiento de más de 200 veces.

El grupo de Ricci-Vitiani observó similares resultados. La inyección subcutánea de células CD133(+) procedentes de tumores humanos en ratones inmunodeficientes reprodujo el tumor original con su heterogeneidad fenotípica, pudo ser pasado seriadamente *in vivo*, mientras las CD133(-) no lo hicieron. Así mismo, las células CD133(+) fueron cultivadas *in vitro* por un año como tumoresferas en medio libre de suero y en ese tiempo mantuvieron su capacidad tumorigénica. Los autores concluyen que el CC es propagado por un pequeño número de células indiferenciadas CD133(+).

Schneider et al. (2012) se propusieron caracterizar a CD133 como marcador de CTC en CC, para ello emplearon 14 líneas celulares de CC humanas, entre ellas las SW620, que proceden de una metástasis en nodo linfático a partir de CC de un paciente masculino de 51 años. Al evaluar la tumorigenicidad de las diferentes subpoblaciones, observaron que las CD133(+) son más tumorigénicas que las CD133(-), ya que, al inyectar cantidades equivalentes de células, las positivas a este marcador dieron lugar a tumor en menos de la mitad del tiempo que las células negativas o las no sorteadas. Más recientemente, en el estudio de Zhou et al. (2016), se propusieron estudiar el papel de la subpoblación CD44^{high}/CD133^{high} en la línea celular HCT-116, de CC. Esa subpoblación mostró mayor capacidad formadora de esferas al ser cultivadas *in vitro* y mayor tumorigenicidad al ser inoculadas en ratones, con respecto a las células negativas a esos marcadores.

Cabe mencionar que, a pesar de los muchos reportes que existen sobre el valor de CD133 como marcador de CT, también se ha reportado su expresión en células diferenciadas (Immervoll et al., 2008). Además, hay resultados contradictorios con respecto a la presencia de CD133 en metástasis, como es el caso del estudio de Shmelkov et al. (2008), donde analizaron los tumores metastásicos en hígado derivados de CC, en 19 pacientes. Tanto las células CD133(+) como CD133(-) de las metástasis dieron lugar a colonoesferas *in vitro* y produjeron tumor en ratones inmunodeficientes. Incluso se observó que las células metastásicas CD133(-) formaron tumores de mayor tamaño que las positivas. Estos resultados siembran dudas con respecto a la validez de CD133 como marcador de CTC, pero debe

tenerse en cuenta que no es un marcador exclusivo de CT y debe usarse en combinación con otros marcadores de troncalidad (Wu y Wu, 2009).

Con respecto a la expresión de CD133, se ha observado que puede estar regulada por Notch, p53, HIFs y STAT3 en el cáncer. Notch 1 se une al promotor de CD133 y regula su transcripción en células en cultivo de cáncer gástrico y melanoma (Konishi et al., 2016). También está reportado que STAT3 enciende la transcripción de ese gen a través de la regulación positiva de HIFs en células de cáncer hepático (Won et al., 2015). Por otra parte, en células en cultivo de cáncer de pulmón también se observó que la hipoxia induce la expresión de CD133 al promover la unión de Oct4 y Sox2 a la región del promotor 1 de *PROM1*, revelando así otro mecanismo por el cual los HIFs modulan la expresión de CD133 (Liou et al., 2019). Se conoce, además, que p53 regula negativamente la expresión de este marcador al unirse a la región del promotor 5, donde recluta y activa a la HDAC1, la cual tiene promueve el silenciamiento de *PROM1* (Park et al., 2015).

También se ha demostrado en varios tipos de cáncer que CD133 participa en la estabilización de la β -catenina. En el CC la acumulación de β -catenina nuclear y la mayor expresión de CD133 son marcadores de la progresión tumoral y la menor supervivencia de los pacientes (Horst et al., 2009; Mak et al., 2012).

1.7 CD44 como marcador de CTC en CC.

CD44 es una glicoproteína transmembrana de un solo paso, codificada por un gen altamente conservado y complejo, que consiste en 19 exones localizados en el cromosoma 11 en humanos (Zeilstra et al., 2013). Los exones 1-5 y 16-20 de *CD44* producen la forma estándar de la molécula (CD44s, de 85 kDa), mientras los exones 6-15 sufren *splicing* alternativo para formar las isoformas de CD44 con exones variables (CD44v) (Wang et al., 2009; Sahlberg et al., 2014). CD44 comprende una familia de glicoproteínas que funcionan como moléculas de adhesión y correceptores para factores de crecimiento, conectando a componentes de la matriz extracelular, específicamente Ácido Hialurónico y OPN, a la célula y el citoesqueleto. Al modular la señalización por factores de crecimiento, regula importantes procesos como la migración celular, la transición epitelio-mesénquima, la metástasis y la resistencia a apoptosis (Zeilstra et al., 2013). El gen que codifica para este marcador es un importante blanco de la señalización por Wnt, que está muy bien descrita en el CC. La activación de la vía canónica de Wnt promueve la sobreexpresión de CD44 (Ma et al., 2019). Varias isoformas han demostrado estar implicadas directamente en la biología de tumores malignos y correlacionarse con la progresión y metástasis (Zoller, 2011). Se ha observado que las isoformas CD44v se expresan tanto en tejidos normales como en células tumorales, aunque se hallan sobreexpresadas en tejidos malignos (Afify et al., 2016). Así mismo, CD44 aparece expresado al nivel de las criptas basales del colon, pero no en las células diferenciadas (Hu et al., 2009; Motohara et al., 2011).

El estudio realizado por Dalerba et al. (2007) constituye el primer reporte que valida el empleo de CD44 como marcador de CTC en CC. Los autores demostraron que se generaba tumor en los hospedadores inmunodeficientes a partir de todas las muestras evaluadas de CC, empleando tan solo 200 células EpCAM^{high}/CD44(+). Los tumores generados eran histológica y fenotípicamente similares a los de los pacientes. Además, observaron que la expresión de EpCAM y CD44 era mayor en cada paciente en su muestra de CC con respecto al epitelio normal. Los autores también evaluaron la expresión de CD133 y reportaron que presentó una expresión más variable, pero las células CD44(+) se encontraron siempre dentro de la subpoblación CD133(+). Concluyeron que las CTC de CC se encuentran en las subpoblaciones EpCAM^{high}/CD44(+).

Poco después, Du et al. (2008) demostraron que CD44 tiene, en efecto, una importancia funcional para las CTC de CC. Para ello evaluaron la expresión de CD44 y CD133 por inmunohistoquímica en 60 muestras humanas procedentes de tejido de colon normal y de tumores primarios. Observaron que con solo 100 células CD44(+) de tumor primario fue posible generar un tumor en ratones inmunodeficientes, mientras que células individuales CD44(+) formaron tumoroesferas *in vitro*, y éstas a su vez generaron tumor al ser trasplantadas de manera seriada en ratones, que exhibieron las propiedades fenotípicas del tumor primario. También confirmaron por RT-PCR y Western blot, a partir de las muestras, que CD44 se halla expresado en mayor cantidad en tejido maligno, y resaltó la mayor expresión de isoformas con exones variables, entre ellos el exón v6. El *knockdown* de CD44, pero no de CD133, inhibió la clonogenicidad y tumorigenicidad en el modelo de xenotrasplante, lo cual prueba que este marcador tiene un papel funcional relevante para la biología de las células tumorales en el CC.

CD44 también se ha empleado exitosamente para aislar CTC en otras neoplasias, como cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003), de próstata (Collins et al., 2005), de páncreas (Li et al., 2007) y cáncer gástrico (Su et al., 2011). Este marcador se ha asociado, además, con la promoción de un fenotipo más agresivo. Está bien descrita su coexpresión con CD133 en metástasis de cáncer gástrico, de próstata, de hígado y CC (Chen et al., 2011; Eaton et al., 2010; Hou et al., 2012; Huang et al., 2012; Wakamatsu et al., 2012). Entre ellos, el CC es en el que más se ha reportado la presencia de una subpoblación CD44(+)/CD133(+) en las metástasis al hígado. Algunos autores sugieren que CD44 es más importante para la migración celular y la invasividad, por su capacidad de interacción con la matriz extracelular, mientras CD133 controla la capacidad tumorigénica. Se requiere la combinación de ambas capacidades para generar un fenotipo agresivo, con capacidad de invasión y metástasis (Liou et al., 2019).

En el estudio de Wang et al. (2012) analizaron el potencial de CD44 y CD133 como marcadores de CTC en CC empleando 6 líneas celulares, entre ellas las SW620. Para ello se evaluó la capacidad de formación de colonias, la resistencia a drogas y el potencial de migración e invasión. Las células CD44(+) exhibieron mayor proliferación, mayor formación de esferas, resistencia a drogas inductoras de apoptosis y se enriquecieron después de los tratamientos. Sin embargo, encontraron que, entre las CD44(+), la subpoblación CD133(-) tuvo mayor

capacidad de migración e invasión, por tanto, concluyen que en la línea SW620 las CTC están contenidas en la fracción CD44(+)/CD133(-).

Abbasian et al. (2018) realizaron un metaanálisis, a partir de 27 estudios, para evaluar el valor pronóstico de los marcadores CD133 y CD44 en la identificación de CTC en CC. Tomaron en cuenta la formación de esferoides y la tumorigenicidad reportadas de las subpoblaciones aisladas empleando estos marcadores. Concluyeron que CD133 es un poderoso marcador para la identificación de CTC en tumores primarios, pero debería emplearse con cautela en el estudio de líneas celulares. Así mismo afirmaron que el empleo combinado de ambos marcadores es la estrategia más confiable para el aislamiento de CTC de CC, tanto a partir de líneas celulares como de tumores primarios.

En nuestro trabajo analizamos la expresión de CD44 y no sólo la de CD44v6, pues nos interesó observar las variaciones en la expresión de las moléculas CD44 en su totalidad (todas las isoformas), así como los cambios en la expresión de las isoformas que contienen al exón variable 6.

1.8 CD44v6 como marcador de CTC en CC.

La gran variación que se genera por el *splicing* alternativo de CD44 se traduce en diferencias en el segmento proximal de la porción extracelular de la proteína, que es donde se ubican los exones variables. Dichas variaciones alteran sus propiedades de adhesión célula a célula y célula-matriz extracelular. Aunque se ha estudiado más la expresión de CD44s, las isoformas CD44v parecen restringidas a una subpoblación con características de troncalidad y que promueven el fenotipo maligno. En el estudio realizado por Afify et al. (2016) se demostró que, en la mucosa normal del colon y en epitelio hiperplásico, CD44v6 sólo se expresa en la base de las criptas, donde residen las CT y no en el resto del tejido. Además, se ha observado que solamente las isoformas CD44v promueven la generación de adenomas en modelos murinos de poliposis adenomatosa familiar (Zeilstra et al., 2014).

El trabajo de Todaro et al. (2014) constituye el primer reporte que demuestra que CD44v6 es un marcador de las CTC de CC y que juega un papel fundamental para la migración de las células malignas y la formación de metástasis. Como en el estudio de Dalerba et al. (2007) se había reportado a CD44 como un marcador de CT en CC, estos autores quisieron investigar si la expresión de exones variables de esa molécula podría estratificar a las CT CD44(+) en subpoblaciones con diferencias funcionales. Al comparar muestras de tumores primarios y sus respectivas metástasis, observaron transcripción mucho mayor del gen de CD44v6 en las lesiones metastásicas. Cuando se evaluó tumorigenicidad, observaron que tanto las células CD44v6(+) como las CD44v6(-) procedentes de tumoroesferas derivadas de muestras, dieron lugar a tumor *in vivo*, pero las negativas solamente generaron pequeños tumores ortópicos, mientras que las positivas dieron lugar a lesiones ortópicas y metastásicas en hígado, intestino y pulmón. De igual manera,

las células CD44v6(+) frescas aisladas directamente de muestras clínicas, generaron tumores ortópicos y metastásicos, mientras las negativas crecieron localmente como tumores pequeños sin generar lesiones distantes. La capacidad tumorigénica de las células negativas al marcador se perdió en los hospedadores secundarios, lo cual sugiere que la subpoblación CD44v6(-) contiene progenitores amplificadores de tránsito y células diferenciadas no tumorigénicas, mientras las metástasis son generadas exclusivamente por las CD44v6(+).

Encontraron, además, que las células CD44v6(+) exhiben activación de β -catenina y características del programa de Transición Epitelio-Mesénquima (Todaro et al., 2014). La actividad Wnt juega un papel esencial en el mantenimiento de la subpoblación troncal en el intestino y en la autorenovación de las CT en CC (Leedham et al., 2013). Las citocinas liberadas en el microambiente del tumor hacen posible que se mantenga el estado indiferenciado y la actividad clonogénica de las células tumorales (Medema y Vermeulen, 2011). CD44v6 parece jugar un papel importante en la progresión dada su habilidad de unir HGF, OPN y otras citocinas producidas en el microambiente tumoral (Orian-Rosseau, 2010). Este marcador interactúa con el receptor de HGF en presencia de esta citocina y potencia su señalización, la cual provee una ventaja proliferativa (Todaro et al., 2014). De hecho, su expresión es regulada por estas citocinas del microambiente tumoral mediante la regulación de la vía Wnt (Orian-Rosseau, 2015). Al incubar a tumoresferas de células CD44v6(-), que habían demostrado no tener capacidad de autorenovación y por tanto, ser amplificadores de tránsito, con las citocinas HGF, OPN y SDF-1, los autores observaron que estas células empezaron a expresar el marcador y adquirieron un fenotipo más agresivo. Sin embargo, cuando se tomaron células CD44v6(-) diferenciadas de tumores primarios y se expusieron a estas citocinas, no se indujo expresión del marcador (Todaro et al., 2014).

Esto sugiere que solamente en los amplificadores de tránsito se puede inducir la expresión de este marcador de troncalidad. Los autores hipotetizan que esto puede deberse a que las células diferenciadas de CC tienen una baja actividad Wnt a pesar de portar mutaciones que permiten la activación constitutiva de esa vía. En resumen, en este trabajo demostraron que CD44v6 es un marcador funcional de CT en CC, que además confiere a las células la habilidad de migrar a sitios distantes y generar lesiones metastásicas (Todaro et al., 2014).

En el estudio realizado por Lin et al. (2016) se observó que la regulación positiva de la expresión de CD44v6 está estrechamente relacionada con la recurrencia de tumores en pacientes con CC que se sometieron a cirugía curativa y quimioterapia adyuvante. En ensayos *in vitro*, la exposición a drogas quimioterapéuticas, como 5-FU, indujo la expresión de CD44v6 en células de las líneas SW480 y SW620. Así mismo, la sobreexpresión de CD44v6 en esos cultivos celulares indujo quimiorresistencia, Transición Epitelio-Mesénquima y activación de las vías de señalización implicadas en la supervivencia y proliferación.

En otros tipos de cáncer también se ha documentado que CD44v6 es un marcador de CTC que juega un papel fundamental en la progresión del tumor, la metástasis y la supervivencia del paciente. Costa et al. (2001) reportaron que, en cáncer cervical, existe una asociación de la expresión de CD44v6 tras quimioterapia con neoadyuvantes, con un pobre pronóstico para las pacientes. Ni et al. (2014) emplearon cultivos de cáncer de próstata y observaron que el *knockdown* de

CD44v6 aumentó significativamente la quimiosensibilidad y radiosensibilidad de esas células *in vitro*. De modo que, el valor de CD44v6 como marcador de CT en cáncer, ha sido bien demostrado en CC, al igual que en otros tipos de neoplasias, donde tiene una importancia funcional.

1.9 Efecto de la hipoxia sobre las células cancerosas.

La hipoxia es una condición muy relevante en el microambiente de tumores sólidos, incluidos los del colon, que suele acompañarse de privación de nutrientes, como consecuencia del pobre riego sanguíneo (Semenza, 2016). Las áreas hipóxicas surgen temporalmente en los tumores, debido a la rápida proliferación de las células cancerosas y el desarrollo aberrante de la vasculatura. La mayoría de las células expuestas a hipoxia aguda frenan su proliferación o mueren. Sin embargo, bajo hipoxia crónica, una parte de las células malignas sobreviven y adquieren capacidades que le permiten sobreponerse a la escasez de nutrientes y oxígeno e incluso escapar de ese ambiente hostil (Philip et al., 2013). La evidencia experimental indica que los tumores sólidos pueden llegar a tener hasta un 50-60% de regiones hipóxicas (menos de un 3% de O₂), lo cual tiene una gran relevancia clínica, ya que la hipoxia se ha asociado con la metástasis, la resistencia a tratamientos y un mal pronóstico (Endzelins et al., 2018).

Se ha observado que los microambientes hipóxicos inducen cambios fenotípicos en las células cancerígenas que las hace más agresivas, refractarias a tratamientos y propensas a dar lugar a metástasis (Krishnamachary et al., 2003). Estas alteraciones están mediadas por factores de transcripción llamados HIFs, los cuales son mediadores de las rutas de señalización sensibles a oxígeno que regulan múltiples fases de la tumorigénesis como la reprogramación metabólica, angiogénesis, crecimiento, sobrevivencia y resistencia a apoptosis (Carmeliet et al., 2000). Los HIFs en su forma activa son heterodímeros que contienen una subunidad α dependiente de oxígeno y una subunidad β que se expresa constitutivamente. Estos heterodímeros reconocen elementos consenso de 5pb conocidos como elementos de respuesta a hipoxia, que se encuentran en la región UTR de más de 150 genes (Semenza, 2003). Sus subunidades están constituidas por proteínas de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS. En mamíferos existen tres genes que codifican subunidades alfa: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . La subunidad HIF- β (ARNT) también cuenta con tres isoformas funcionales, las cuales son proteínas nucleares no reguladas por cambios en las concentraciones de oxígeno. El papel preponderante que juegan en la biología del cáncer se ha establecido claramente para los factores HIF-1 α y HIF-2 α , pero el de HIF-3 α apenas empieza a ser estudiado (Qiu et al., 2017).

Las subunidades HIF- α , al igual que la subunidad HIF- β , se transcriben y se traducen de manera constitutiva; pero a diferencia de HIF- β , su vida media y su estabilidad dependen de la disponibilidad de oxígeno en la célula. Bajo condiciones de normoxia, tienen una vida media muy corta ya que son degradadas rápidamente vía ubiquitinación y actividad proteosómica mediada por el factor pVHL que es un componente del complejo ubiquitin ligasa E3 (Philip et al., 2013). En condiciones de

hipoxia, la proteína HIF- α logra escapar de la lisis por proteosomas lo cual permite su acumulación y translocación al núcleo donde se dimeriza con HIF- β . El heterodímero HIF- α/β se une a la región HRE de las secuencias promotoras o de los *enhancers* de los genes blanco (Choudhry y Harry, 2018). Además de la ruta dependiente de oxígeno, la estabilidad de los HIFs- α también se regula de manera independiente de oxígeno por la activación de rutas de señalización de factores de crecimiento, tales como la vía de PI3K/Akt/mTOR, que promueven la estabilidad y traducción del ARNm que codifica las subunidades HIFs- α . Esta forma de activación independiente de oxígeno es particularmente relevante en las células malignas, pues frecuentemente tienen mutaciones activadoras en estas vías de señalización (Vaupel y Mayer, 2007). Consistente con esto, en nuestro grupo se observó la expresión de los HIFs en condiciones de normoxia en células en cultivo de CC (Santoyo-Ramos et al., 2014).

En cuanto a qué genes regula cada HIF, se ha demostrado que los tres HIFs comparten algunos genes blanco, pero en general tienen funciones diferentes. HIF-1 α induce la expresión de genes implicados en la reprogramación metabólica, como los que codifican para las enzimas glicolíticas piruvato cinasa M, fosfoglicerato cinasa, y lactato deshidrogenasa A, entre otros, mientras que HIF-2 α , induce la expresión de factores de troncalidad como Oct4, Sox2, Nanog, y otras moléculas, como ciclina D1, TGF- α y TGF- β (Tang et al., 2018). No obstante, HIF-1 α también contribuye a la troncalidad por su interacción con ligandos Notch (Vadde et al., 2017). Así, a través de los HIFs se controlan transcripcionalmente un grupo de factores que contribuyen a aumentar la resistencia a radiación y quimioterapia, así como a la emergencia de un fenotipo más peligroso. Se conoce que la actividad de estos factores favorece la inhibición de senescencia y de apoptosis, se promueve el establecimiento de autofagia, la reparación de los daños al ADN, etc, todo lo cual contribuye a la malignidad de las células (Sullivan et al., 2008). La hipoxia está asociada con el mantenimiento, además, de las CTC. Varios estudios muestran que la hipoxia inhibe la diferenciación de células progenitoras y células mesenquimales troncales y que, bajo condiciones hipóxicas, las células malignas suelen mostrar mayor potencial tumorigénico (Ezashi et al., 2005; Lin et al., 2010).

HIF-1 α se ha encontrado sobreexpresado en muchos tipos de neoplasias, como cáncer de pulmón, de próstata, de páncreas, de mama, cerebro y CC (Nagaraju et al., 2015). En líneas celulares de CC se ha observado que HIF-1 α promueve la Transición Epitelio-Mesénquima, que es necesaria para la invasión (Krishnamachary et al., 2003). También se ha demostrado que promueve la expresión de marcadores de troncalidad, y su *knockdown* provoca disminución de la expresión de CD44 y Oct4 en esas células (Santoyo-Ramos et al., 2014).

Está bien documentado, además, el efecto que la hipoxia ejerce sobre la expresión de CD44 y CD44v en CC (Wohlleben et al., 2017). Además, se ha observado que esta condición fisiológica aumenta directamente la actividad del promotor de *PROM1* (Tang et al., 2018). En células de cáncer de pulmón se observó que la hipoxia induce la expresión de CD133 mediante la unión de Oct4 y Sox2 a la región del promotor 1 de *PROM1* (Liou et al., 2019). En el estudio de Endzelins et al. (2018), se ha observado que la hipoxia promueve la producción de vesículas extracelulares por las líneas SW480 y SW620. Las células hipóxicas SW480

internalizaron estas vesículas más eficientemente y exhibieron como consecuencia mayor motilidad, invasividad y enriquecimiento en marcadores de troncalidad, mientras que las vesículas no tuvieron esos efectos en la línea metastásica. Los autores concluyeron que las vesículas derivadas de células cancerosas hipóxicas confieren mayor agresividad a las células del tumor primario que se hallan en normoxia. Esto facilitaría su supervivencia y escape hacia otros sitios anatómicos. Tang et al. (2018) reportaron que en tumores de CC, HIF-1 α y TGF- β 2 secretado por fibroblastos asociados a cáncer, convergen para promover la troncalidad y la resistencia intrínseca a la quimioterapia. Wu et al. (2015) demostraron que HIF-2 α media la expresión del Factor Inhibidor de Leucemia en CC, el cual pertenece a la superfamilia de la IL-6 y en tumores sólidos juega un papel fundamental en la progresión. En resumen, ambas isoformas de los HIFs son relevantes en la expresión de marcadores de troncalidad en CC, pero HIF-2 α se ha asociado mayormente a la promoción del fenotipo troncal (Vadde et al., 2017).

1.10 Metabolismo de las células cancerosas y efecto del estrés nutricional.

El metabolismo dentro de un tumor sólido es muy diferente al del tejido normal. Este fenómeno fue descrito por Otto Warburg. En tejidos normales, la glicólisis genera cerca del 10% del ATP celular, mientras el 90% es generado por actividad mitocondrial (Semenza, 2016). Él observó que, en tumores, no obstante, cerca del 50% de la energía celular se genera por glicólisis, y el resto por mitocondrias, lo cual se conoce como “Efecto Warburg” (Schulze y Harris, 2012). Este cambio ocurre incluso con alta disponibilidad de oxígeno, disponible para la función mitocondrial, y se llama glicólisis aerobia (Nam et al., 2016). Esta dependencia de las células tumorales de la glicólisis para generar energía, hace que consuman mucha más glucosa, debido a la baja eficiencia de este modo de producción de ATP, aunque sí es más rápido que la fosforilación oxidativa vía mitocondrias (Cairns et al., 2011). Una de las principales razones para este metabolismo alterado son las condiciones tan particulares de estrés que se dan dentro del tumor, que suele exponerse a hipoxia, acidosis y mayor presión de fluido intersticial debido a la pobre vascularización. Un porcentaje importante del tumor se encuentran frecuentemente alejadas de vasos sanguíneos, lo cual causa hipoxia, bajos niveles de nutrientes y mayor nivel de productos de desecho (Levine y Puzio-Kuter, 2010).

El mecanismo más importante de respuesta de las células malignas a estas condiciones es la activación de HIF-1 α . Este factor de transcripción promueve al cambio hacia metabolismo glicolítico y menor actividad mitocondrial. Se ha demostrado que también se induce por otras vías, como tras la activación de oncogenes, la pérdida de función de genes supresores de tumores, aumento de metabolitos como las especies reactivas de oxígeno y la estimulación por factores de crecimiento, por lo que se puede hallar HIF-1 α activo en regiones hipóxicas, así como en regiones bien oxigenadas del tumor (Nam et al., 2016).

HIF-1 α estimula la producción glicolítica de energía al transactivar la expresión de genes implicados en la internalización de glucosa, como el de GLUT1, y de enzimas responsables de su metabolismo, como PFK1. El bajo rendimiento energético de la glicólisis logra suplir las necesidades de las células cancerosas ya que éstas, en

cambio, internalizan grandes cantidades de glucosa. HIF-1 α además disminuye la fosforilación oxidativa mitocondrial al transactivar a genes como el de PDK1 (Dodd et al., 2015). Estos dos efectos de HIF-1 α reducen la demanda de oxígeno en células hipóxicas, mientras que provee suficiente energía. De este modo promueve los cambios metabólicos observados en células cancerosas, identificados por Warburg (Vander Heiden et al., 2009).

Estudios que han analizado los genes blanco de los HIFs, reportan que la mayoría de los genes activados por HIF-1 α se relacionan con la reprogramación metabólica. HIF-1 α promueve la expresión de transportadores de glucosa, enzimas implicadas en su procesamiento metabólico hasta piruvato (como hexocinasas) y enzimas de procesamiento del piruvato (Ho et al., 2012).

Existen dos hipótesis con respecto a las ventajas que confiere a la célula maligna la reprogramación de su metabolismo. Una afirma que la menor actividad mitocondrial ejerce un efecto protector para la célula al garantizar una menor producción de especies reactivas de oxígeno. Grandes cantidades de estos radicales libres resultan tóxicas para la célula ya que dañan al ADN y otras moléculas, no obstante, son productos colaterales del metabolismo aerobio normal de las células. Otra hipótesis afirma que la actividad mitocondrial reducida permite una mayor producción de sustratos anabólicos (Semenza, 2010). Los sustratos generados en la glicólisis o en el ciclo de ácidos tricarbóxicos pueden irse a vías de síntesis de macromoléculas, en lugar de alimentar constantemente la progresión de las vías metabólicas que le siguen a la glicólisis. Esta generación de sustratos es fundamental para las células malignas en rápida proliferación, que deben duplicar sus componentes antes de cada división (Denko, 2008).

Se ha demostrado también que CD44 tiene una importante conexión con la reprogramación metabólica en células cancerosas. Su porción intracelular interactúa con la enzima Piruvato Cinasa M2, que está implicada en el efecto Warburg (Hitosugi et al., 2009). La expresión de este marcador promueve el fenotipo glicolítico maligno precisamente mediante la regulación de la actividad de esa enzima en células cancerosas hipóxicas (Tamada et al., 2012). En el estudio de Nam et al. (2016) confirmaron la relación entre CD44 y el fenotipo glicolítico en células en cultivo de cáncer de mama, cuando hicieron *knockdown* del marcador y observaron que se afectó la internalización de glucosa, la producción de ATP y de lactato por esas células.

Además de los efectos que tiene la privación de nutrientes a nivel celular, se ha observado que el estatus nutricional del organismo completo también influye fuertemente al epitelio intestinal (Gehart y Cleveres, 2018). Está reportado que la privación aguda de nutrientes aumenta la prevalencia de CT en el intestino delgado en ratones. Así mismo, la inanición crónica aumenta el número de células en la base de la cripta, mientras se reduce la proliferación de las células amplificadoras de tránsito, lo cual resulta en una disminución de la superficie del epitelio. Sin embargo, al restaurar una dieta normal en los animales, estos efectos revirtieron rápidamente, transcurridos solo 3 días de ingesta normal (Yilmaz et al., 2012, Tinkum et al., 2015). El efecto parece ser indirecto, pues lo que promueve es un aumento de la cantidad de células Paneth en intestino delgado y de actividad del nicho. Los autores postulan que, el significado o utilidad de esta respuesta del tejido es que lo deja listo para una regeneración inmediata cuando se restaura la ingesta

de alimentos. De manera muy interesante, la ingesta excesiva de nutrientes también tiene efectos directos en la cripta intestinal. Se describió en el estudio de Beyaz et al. (2016) que ratones sometidos a una dieta rica en grasas, muestran una disminución en el número de células Paneth, y a pesar de ello, un aumento en el número de CT intestinales del 50% con respecto a ratones alimentados normalmente, mientras disminuye ligeramente el número de enterocitos. En ese estudio observaron además que, ante la dieta rica en grasas, las CT se vuelven más independientes de las células Paneth del nicho, al expresar por sí mismas los ligandos que necesitan para proliferar. También se vuelven más sensibles a Wnt, por lo que pueden mantener su troncalidad más arriba en la cripta. Como la independencia del nicho es un requerimiento para la formación de tumor intestinal (Gehart y Clevers, 2018), estos datos podrían explicar la alta correlación que existe entre la obesidad y el CC (Bardou et al., 2013).

En resumen, los HIFs juegan un papel fundamental en la adaptación de las células cancerosas a la isquemia, frecuentemente encontrada en tumores sólidos como los del colon. HIF-1 α es responsable de la reprogramación metabólica, mientras que ambos HIFs promueven la expresión de factores de troncalidad y un fenotipo más agresivo. En el trabajo de Santoyo-Ramos et al. (2014), realizado en nuestro grupo, se observó que el *knockdown* de HIF-1 α produjo disminución de CD44 y Oct4 en la línea SW480, mientras que el *knockdown* de HIF-2 α tuvo el efecto opuesto en esas células. Teniendo esto en cuenta, nos propusimos observar cómo varía la expresión de los marcadores de troncalidad CD133 y CD44v6 en células de CC de las líneas SW480 y SW620 ante diferentes niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-2 α , que responden a condiciones fisiológicas como la deprivación de nutrientes y la hipoxia. Para ello, planteamos el siguiente objetivo general y objetivos específicos:

2. Objetivo general

Evaluar la expresión de los marcadores de troncalidad CD133 y CD44v6 en células de CC en cultivo ante diferentes niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-2 α , establecidos mediante estrés nutricional, hipoxia o *knockdown*.

3. Hipótesis

Se espera que aumente la expresión de los marcadores de troncalidad CD133 y CD44v6 en cultivos celulares de CC en condiciones de hipoxia o de estrés nutricional, mientras que el *knockdown* de HIF-2 α produzca su disminución, porque se ha demostrado que esas condiciones fisiológicas promueven un fenotipo troncal mediado por los HIFs en varios tipos de cáncer, incluido el CC, así como que HIF-2 α juega un papel importante en la expresión de marcadores de troncalidad.

4. Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión basal de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares de CC en cultivo SW480 y SW620, así como en las células no malignas de colon 112CoN.
2. Analizar el efecto del estrés nutricional en la expresión de los marcadores CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares malignas.
3. Evaluar la expresión de los HIFs en las células malignas en condiciones de hipoxia, comparado con normoxia.
4. Analizar el efecto que tiene la hipoxia en la expresión de los marcadores de troncalidad en las células malignas en cultivo.
5. Analizar el efecto que tiene el *knockdown* de HIF-2 α en la expresión de los marcadores de troncalidad en las células malignas, con respecto a cultivos control que expresan los HIFs.

5. Materiales y métodos

5.1 Líneas celulares empleadas.

Se emplearon como modelo experimental las líneas celulares 112CoN, de colon normal, y las líneas de cáncer de colon SW480 y SW620.

Las células 112CoN (ATCC CRL1541™) proceden del colon normal de un feto femenino de 22 semanas de gestación. Poseen morfología fibroblástica y son adherentes. Se cultivaron en medio DMEM con 1,5g/L de NaHCO₃, suplementado con 10% de SFBI, antibiótico-antimicótico (120 mg/ml penicilina y 200 mg/ml estreptomycin) y 2 mM L-glutamina. Fueron incubadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se cultivaron siempre hasta un 80% de confluencia.

Las células SW480 (ATCC CCL228™) proceden de un adenocarcinoma colorrectal de un paciente masculino de 50 años. Tienen morfología epitelial y son adherentes. Las células SW60 (ATCC CCL227™) son de adenocarcinoma colorrectal, aisladas de una metástasis en nodo linfático que surgió un año después a partir del tumor de donde se aislaron las SW480. El cultivo exhibe una morfología diferente de la línea de tumor primario. Consta de células más pequeñas y redondas, adherentes. Ambas líneas malignas se cultivaron en medio DMEM-F12 con 1,2 g/L de NaHCO₃, suplementado con 5 % de SFBI, antibiótico-antimicótico y

2 mM glutamina. Fueron incubadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se cultivaron hasta un 80% de confluencia (Luna-Ulloa et al., 2011).

5.2 Anticuerpos empleados.

En la Tabla 1 se listan los anticuerpos que se emplearon para la detección de proteínas por Wb.

Tabla 1. Información de los anticuerpos empleados para la detección de proteínas por Wb.

Reactividad	Origen	Compañía	Código de catálogo	Dilución de trabajo
anti-GAPDH (monoclonal, reconoce GAPDH recombinante de origen humano)	ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	1: 5000
anti- CD44 (policlonal, reconoce a los aminoácidos 692-742 de la molécula CD44 humana, que están dentro de la región "estándar")	conejo	abcam	ab157107	1:3000
anti-CD44v6 (monoclonal, reconoce un epítipo presente en el exón variable 6 de las isoformas CD44v de humano)	ratón	eBioscience	BMS125	1:2000
anti-CD133 (policlonal, reconoce desde el residuo de aminoácido 800 al extremo C'-terminal de CD133 humana)	conejo	abcam	ab19898	1:3000
anti-HIF-1α (policlonal, reconoce los residuos de aminoácidos que flanquean a la Ser653 del HIF-1 α humano)	conejo	Cell Signaling Technology	3716S	1:1000

Reactividad	Origen	Compañía	Código de catálogo	Dilución de trabajo
anti- HIF-2α (monoclonal, reconoce los residuos que flanquean a la Ala758 de la proteína HIF-2 α humana)	conejo	Cell Signaling Technology	7096S	1:1000
anti-IgG de conejo, conjugado con HRP (policlonal, detecta cadena pesada y ligera de IgG de conejo)	cabra	R&D	HAF008	1:3000
anti-IgG de ratón, conjugado con HRP (policlonal, detecta cadena pesada y ligera de IgG de ratón)	cabra	Thermo Scientific	31430	1:2000

5.3 Ensayo de inducción de estrés nutricional.

Para el ensayo de estrés nutricional se incubaron las cajas de células SW480 y SW620 con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution 1 X de Gibco, número de catálogo 14065) por 4 h, 8 h, 16 h y 24 h y se comparó la expresión de los marcadores evaluados con respecto a cultivos control (0 h de exposición) incubados en presencia de medio de cultivo completo suplementado con SFBI al 5 %. Transcurridos los diferentes tiempos, se eliminó la HBSS y se procedió directamente a la obtención del extracto total para el Wb.

5.4 Ensayo de inducción de hipoxia.

Para mimetizar la condición de hipoxia en los cultivos de células cancerosas SW480 y SW620, se empleó CoCl₂. El cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl₂ • 6H₂O, Peso Molecular= 237.9 M) es un inductor químico de hipoxia que estabiliza a HIF-1 α . Es soluble en agua y se prepara a 25 mM en agua estéril como solución

stock (Wu y Yotnda,2011). A partir de ese *stock*, se añadió a los cultivos celulares para rendir una concentración de 300 μ M en medio DMEM-F12 suplementado con SFBI al 5 %, se incubó por 6 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio con cobalto de las cajas y se procedió directamente a la obtención del extracto total para el Western blot.

5.5 Obtención de extractos totales a partir de las células en cultivo y cuantificación de proteínas.

Para la obtención del extracto total a partir de las células en cultivo se procedió a lavar la monocapa con PBS frío hasta eliminar el medio de cultivo completamente. Luego se añadieron 150 μ L de buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.5 % Deoxicolato de sodio, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil, 10 μ g/ml de leupeptina y 0.1 mg/ml de inhibidores de tripsina) a cada caja y se mantuvo en hielo. Se colectó todo el material celular por raspado suave, que se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Se colectó el sobrenadante e inmediatamente se tomó una alícuota para la cuantificación de proteínas. Para la conservación de la muestra se añadió Leammli 2X y β -mercaptoetanol al 5% (Velázquez et al., 2017).

Para la cuantificación de proteínas se tomaron 10 μ L de muestra y se añadieron 790 μ L de agua bidestilada más 200 μ L del reactivo colorante de Bio-Rad. Se midió la absorbancia a 595 nm y se interpoló el valor obtenido a una curva patrón confeccionada a partir de concentraciones conocidas de IgG, medidas previamente por este método, lo cual nos da la concentración de proteína en cada muestra.

5.6 Electroforesis, Wb y análisis densitométrico.

Se separaron 50 μ g de proteína total de cada muestra en geles de poliacrilamida al 8 o 10% por SDS-PAGE. La corrida electroforética se llevó a cabo con 40 mA por cada gel. Posteriormente se transfirió el contenido de los geles a membranas de nitrocelulosa, por transferencia semihúmeda, empleando 130 mA por gel, durante 2 h. Luego se bloquearon las membranas con leche al 5 % en TBS durante 1 h en agitación suave. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C, en agitación suave durante toda la noche (Velázquez et al., 2017). Posteriormente, los anticuerpos secundarios se incubaron a temperatura ambiental por 1.5 h. Para el revelado se empleó el kit Supersignal con anticuerpos conjugados con HRP, tal como se describe en el trabajo de Luna-Ulloa et al. (2011). Se empleó GAPDH como control de carga (Gassmann et al., 2009). Las placas de revelado fueron escaneadas y las imágenes, procesadas en el software Image J para el análisis densitométrico. Las gráficas derivadas de este análisis se generaron en el SigmaPlot. Los valores numéricos que se muestran en el eje “y” de las gráficas se corresponden a Unidades

Arbitrarias (UA) de Expresión de los Marcadores. Se normalizó contra el control de carga en cada muestra y los valores reportados como medida de la expresión de estos marcadores (UA) indican la relación con respecto al valor del cultivo control en cada experimento, el cual se tomó como “1”.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos tras la densitometría, se realizó prueba paramétrica de *t* de Student y la prueba de Tukey para comparación de medias múltiples, la cual se encuentra disponible en el sitio: <http://vassarstats.net/>. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como diferencia estadísticamente significativa (*), y $p < 0,01$ como doblemente significativa (**).

5.7 Protocolo de Transfección para el *knockdown* de HIF-2 α .

Para el *knockdown* de HIF-2 α se procedió tal y como se reporta en el estudio de Santoyo-Ramos et al. (2014). Se transfectaron células SW480 a un 80% de confluencia, empleando Lipofectamina 2000, con 1 μ g del plásmido pSUPER GFP 2K, descrito en el trabajo de Imamura et al. (2009), el cual expresa un siRNA contra el gen de HIF-2 α , y contiene un marcador de resistencia a G418 (Gentamicina) para la selección de los transfectantes estables. Tras 4 semanas de selección en presencia de 500 μ g/mL de G418 en el medio de cultivo, las células transfectadas fueron colectadas y lisadas para el análisis de la expresión de HIF-2 α y de los marcadores de troncalidad, a partir de sus extractos totales.

6. Resultados

6.1 Evaluación de la expresión de CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares estudiadas.

En nuestro estudio empezamos por evaluar la expresión basal de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6, en la línea celular de colon normal y las líneas cancerosas, en condiciones de cultivo general. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. En el Wb correspondiente a cada marcador, se señala con flechas las bandas proteicas que se tomaron en cuenta para el análisis densitométrico.

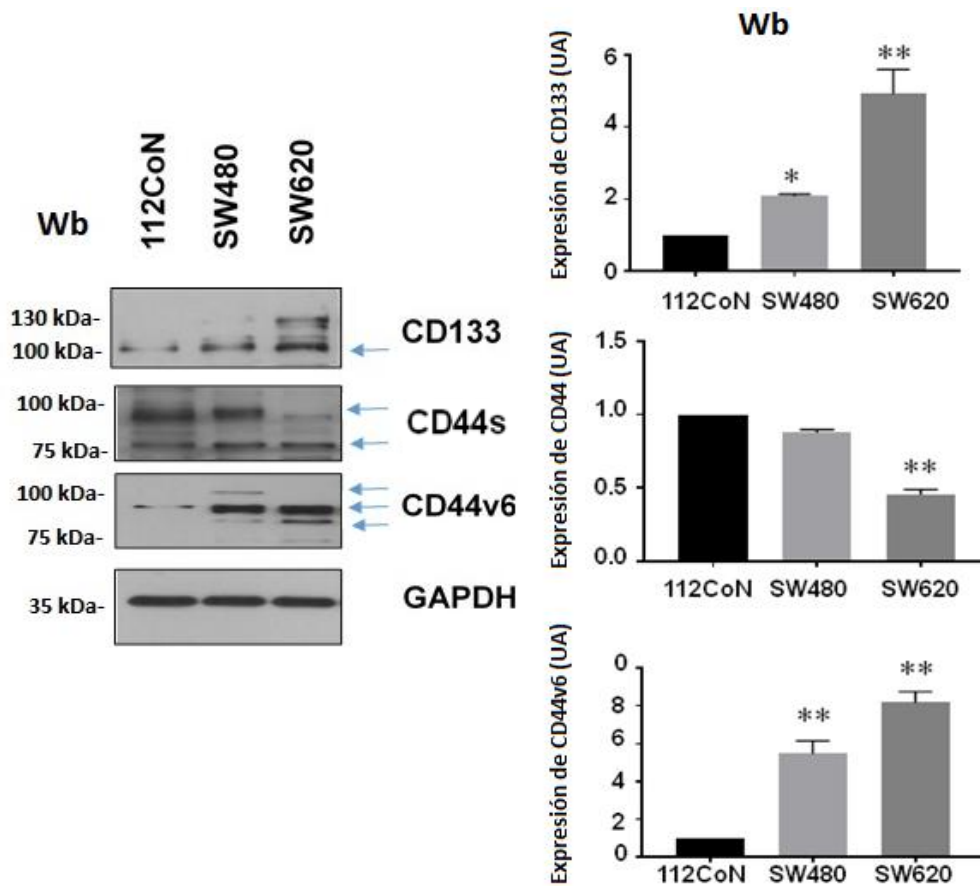


Figura1. Expresión de CD133, CD44s y CD44v6 en las líneas celulares 112CoN, SW480 y SW620. El nivel de expresión en cada caso está expresado como Unidades Arbitrarias (UA), que indican la variación con respecto al cultivo control en cada experimento (112CoN). Los datos están normalizados con respecto al control de carga en cada muestra (GAPDH). Se señalan las variaciones significativas *($p < 0.05$) y doblemente significativas **($p < 0.01$). Se indican los pesos moleculares (kDa) y con flechas las bandas proteicas de interés para cada marcador de troncalidad.

En la línea 112CoN se registró expresión de los tres marcadores, pero en menor cantidad que en las líneas malignas, especialmente para el caso de CD133 y CD44v6. Esto puede deberse a que las 112CoN son una línea celular fetal, por tanto, cabe esperarse que presente marcadores de troncalidad. Se observó expresión de CD44s en un nivel equiparable al de la línea SW480. Estas últimas células tuvieron expresión los tres marcadores, pero mayormente de CD44 y CD44v6. En el caso de las SW620, mostraron mayor expresión de los marcadores CD133 y CD44v6, superando a la línea procedente de tumor primario. Resultados similares han sido observados con anterioridad por nuestro grupo mediante citometría de flujo. En el caso de CD44 y CD44v6, se registraron varias bandas proteicas debido a que el gen genera isoformas con diferente contenido de exones producto del *splicing* alternativo y, por tanto, diferente peso molecular (al que también puede contribuir la glicosilación). El anticuerpo dirigido contra la región “estándar” de la molécula (CD44s), detecta el total de moléculas CD44, tanto las más pequeñas como las que contienen exones variables (incluido el 6), mientras que el anticuerpo dirigido a CD44v6, detecta todas las proteínas que contienen ese exón, las cuales pueden tener también otros y así observarse como varias bandas en el Wb. CD133 es una molécula que también está sujeta a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, pudiendo alcanzar los 120 kDa de peso molecular (la proteína es de 97 kDa). En este experimento observamos una banda que excede el peso máximo esperado, por eso no se tomó en cuenta para el análisis densitométrico.

6.2 Evaluación de la expresión de los marcadores de troncalidad como respuesta al estrés nutricional.

Se procedió a estudiar el efecto que el estrés nutricional ejerce sobre la expresión de los marcadores de troncalidad en las células SW480 y SW620, exponiendo a los cultivos a solución HBSS por diferentes tiempos. Primeramente, se evaluó los niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-2 α en las células estresadas, con respecto a cultivos control (0 h de exposición), pues se conoce que estos factores de transcripción están implicados en las respuestas celulares a algunos tipos de estrés, como la privación de nutrientes y que la adaptación metabólica es mediada por HIF-1 α .

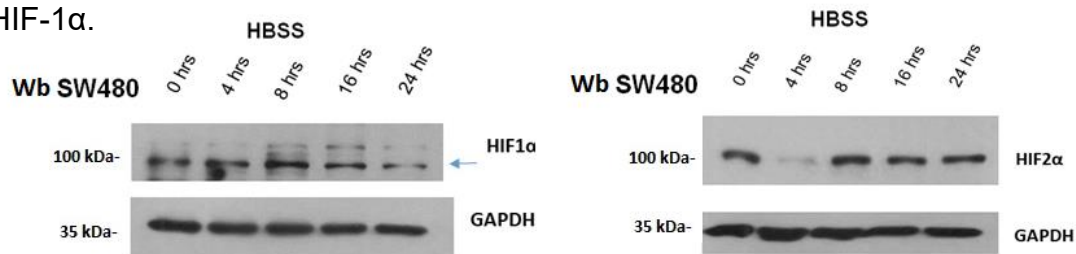


Figura 2. Expresión de HIF-1 α y HIF-2 α en células SW480 en estrés nutricional. Se empleó GAPDH como control de carga. Los cultivos expuestos a 0 h de estrés nutricional se tomaron como controles. Se indican los pesos moleculares (kDa) y con una flecha la banda proteica de interés para HIF-1 α .

Como se observa, se encontró un aumento en el nivel de expresión de HIF-1 α a las 8 y 16 h de estrés nutricional. Esto concuerda con resultados obtenidos anteriormente en nuestro grupo. Por su parte, HIF-2 α experimentó una disminución abrupta a las 4h, pero se estabilizó a un nivel similar al del cultivo no estresado a partir de las 8 h. HIF-1 α es el miembro de esta tríada de factores de transcripción que se halla típicamente implicado en la reprogramación metabólica de células cancerosas y la resistencia a estrés nutricional. Su importante papel en el metabolismo se refleja en el aumento que experimentó como respuesta a la privación de nutrientes. Posteriormente quisimos evaluar si ese aumento en la expresión de HIF-1 α se correspondió con un aumento en la expresión de los marcadores de troncalidad evaluados. Los resultados se muestran en la Figura 3.

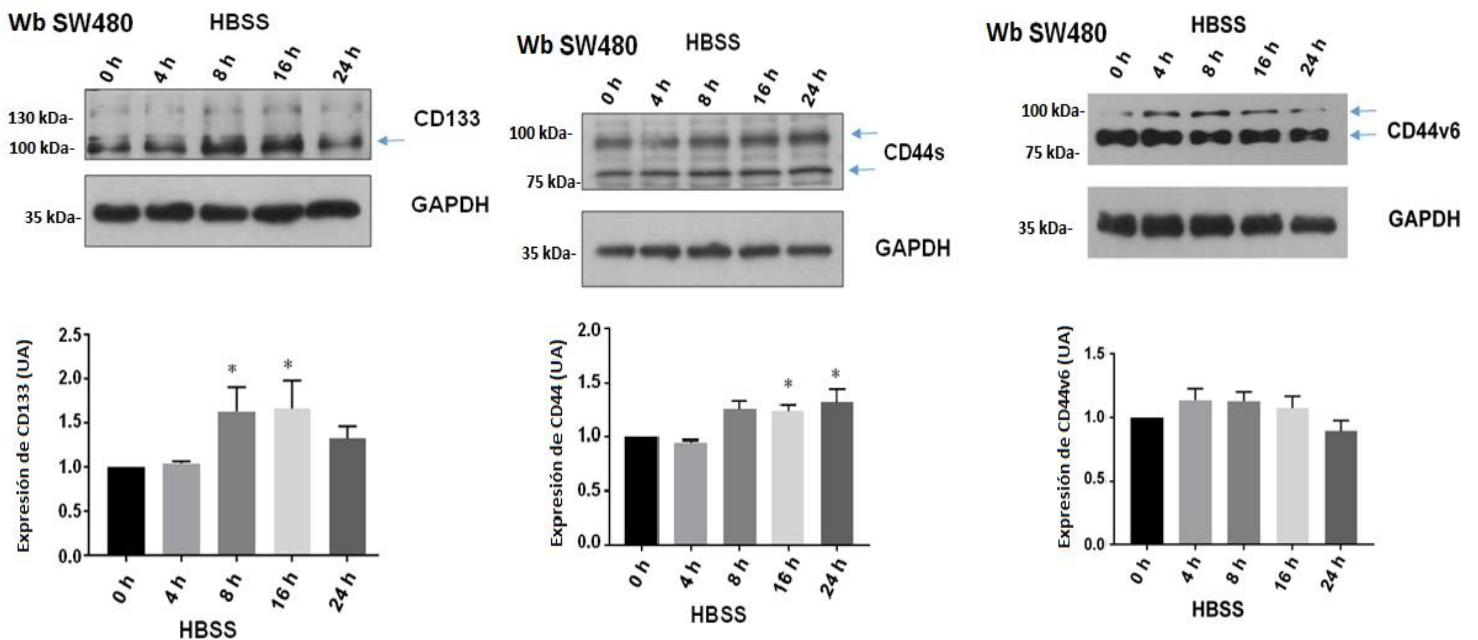


Figura 3. Expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44s y CD44v6 en células SW480 en estrés nutricional. El nivel de expresión en cada caso está expresado como Unidades Arbitrarias (UA), que indican la variación con respecto al cultivo control en cada experimento (0 h de exposición a estrés nutricional). Los datos están normalizados con respecto al control de carga en cada muestra (GAPDH). Se señalan las variaciones significativas *($p < 0.05$). Se indican los pesos moleculares (kDa) y con flechas las bandas proteicas de interés para cada marcador de troncalidad.

Se evaluó por Wb la expresión de los marcadores en los cultivos estresados y se observó un aumento significativo en la expresión de CD133 y CD44s a partir de las 8 h de tratamiento con solución HBSS. Esta mayor expresión coincide en tiempo con el aumento observado en la expresión de HIF-1 α , lo cual nos sugiere que esos

marcadores de troncalidad podrían jugar un papel importante en la adaptación al estrés nutricional por parte de estas células, y que HIF-1 α puede estar induciendo su expresión. En este experimento se evaluó a CD133 pues, previamente en nuestro grupo se observó por citometría de flujo que, en las células SW480 incubadas en estas condiciones, empiezan a aparecer una subpoblación de dobles positivas, para CD133 y CD44.

Luego se realizó el mismo ensayo en las células metastásicas SW620, empleando iguales condiciones experimentales. Los niveles de expresión de los marcadores se muestran en la Figura 4.

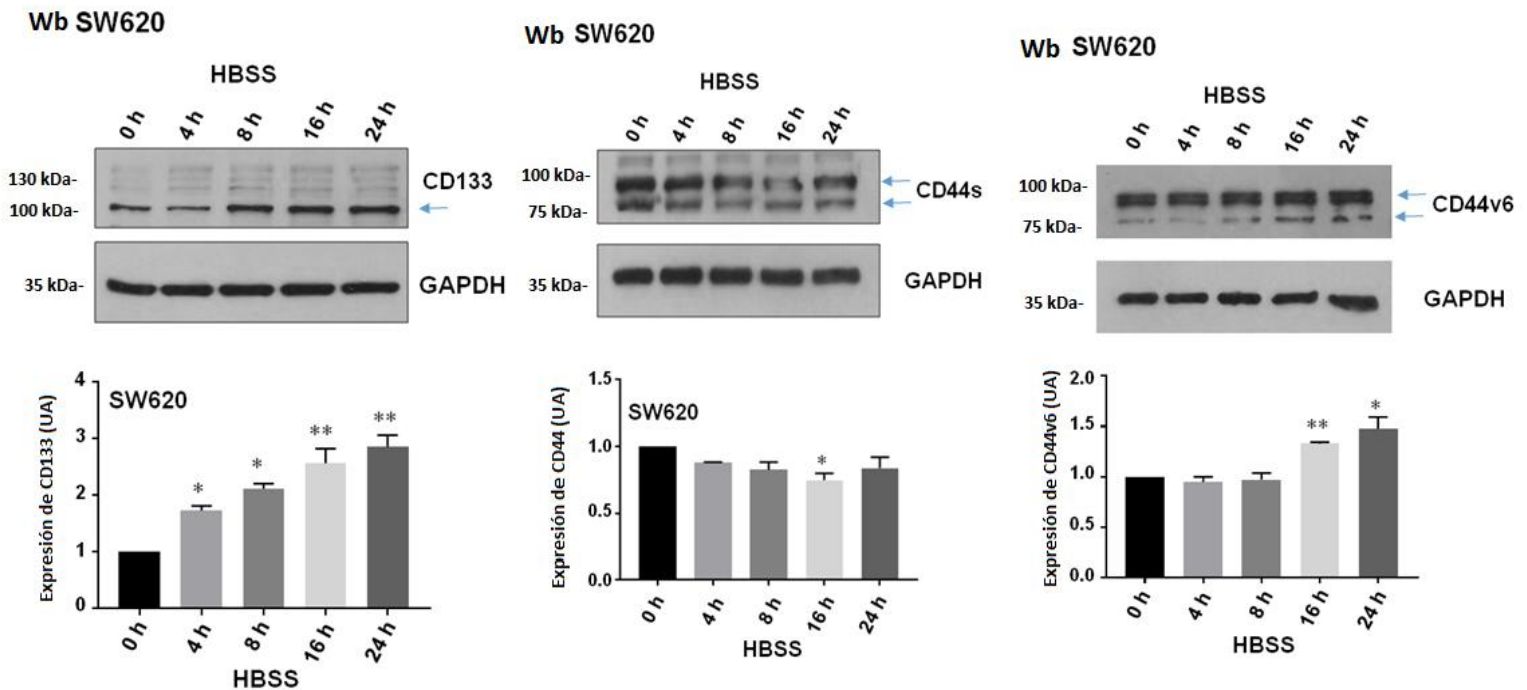


Figura 4. Expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44s y CD44v6 en células SW620 en estrés nutricional. El nivel de expresión en cada caso está expresado como Unidades Arbitrarias (UA), que indican la variación con respecto al cultivo control en cada experimento (0 h de exposición a estrés nutricional). Los datos están normalizados con respecto al control de carga en cada muestra (GAPDH). Se señalan las variaciones significativas *($p < 0.05$) y doblemente significativas **($p < 0.01$). Se indican los pesos moleculares (kDa) y con flechas las bandas proteicas de interés para cada marcador de troncalidad.

Al exponer esta línea a estrés nutricional se registró un aumento significativo de la expresión del marcador CD133 desde las 4 h, que fue incrementándose hasta el tiempo máximo evaluado de 24 h. CD44v6 también aumentó a las 16 y 24 h, con respecto a los controles. CD44 no varió significativamente hasta las 16 h de exposición a la solución, cuando incluso experimentó una disminución.

En conjunto, estos datos sugieren que la exposición de células malignas de colon a condiciones de estrés nutricional, como las que frecuentemente enfrentan en el

microambiente tumoral debido a su rápido crecimiento, puede inducir un aumento en la expresión de estos marcadores de troncalidad. Éstos pueden tener una importancia funcional que les confiera ventajas para adaptarse y sobrevivir en esas condiciones de estrés.

6.3 Estudio del efecto de la hipoxia y del *knockdown* de HIF-2 α en la expresión de los marcadores de troncalidad.

Se procedió a evaluar los niveles de expresión de los marcadores en las células malignas expuestas al mimetizador de hipoxia CoCl₂, así como en células SW480 en que se disminuyó la expresión de HIF-2 α mediante el *knockdown* de su gen. Se empezó por comprobar la estabilización de ambos factores de transcripción con el empleo del CoCl₂ y la disminución de la expresión de HIF-2 α como consecuencia del *knockdown*, en células SW480. Las células knockeadas se obtuvieron mediante la transfección de un plásmido pSUPER GFP 2K, que produce un siRNA contra el gen de HIF-2 α . Los resultados se muestran en la Figura 5.

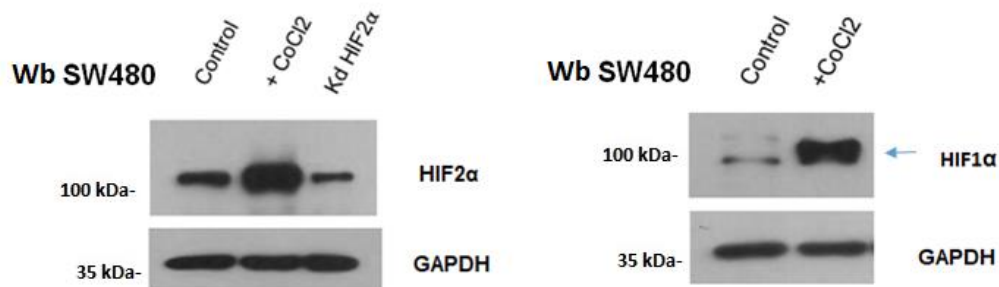


Figura 5. Expresión de HIF-1 α y HIF-2 α en células SW480 control (expresión basal de los HIFs), en presencia de 300 μ M de CoCl₂ (inducción de los HIFs) y en células con *knockdown* para HIF-2 α (disminución de su expresión). Se empleó GAPDH como control de carga. Se indican los pesos moleculares (kDa) y con flecha la banda proteica de interés para HIF-1 α .

En este ensayo se observó que las SW480 expresan normalmente HIF-1 α y HIF-2 α aún en condiciones de normoxia (cultivos control). Mientras que aumenta la expresión de ambos HIFs cuando se incuban por 6 h en presencia de 300 μ M de CoCl₂, confirmando que este compuesto mimetiza eficientemente las condiciones de hipoxia, ya que estabiliza los niveles proteicos de los HIFs. También se comprobó la disminución de la expresión de HIF-2 α como consecuencia del *knockdown* de ese gen en la línea SW480. Con el empleo de este plásmido, en las condiciones experimentales descritas en los Materiales y Métodos, se logró observar una reducción de la proteína HIF-2 α , con respecto al cultivo control, por tanto, procedimos al siguiente objetivo específico de nuestro estudio.

6.3.1 Estudio del efecto de la hipoxia en la expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en células de CC.

Se evaluó la expresión de los marcadores de troncalidad en cultivos de SW480 y SW620 en presencia de CoCl₂ con las condiciones experimentales descritas anteriormente y se obtuvieron los resultados de la Figura 6.

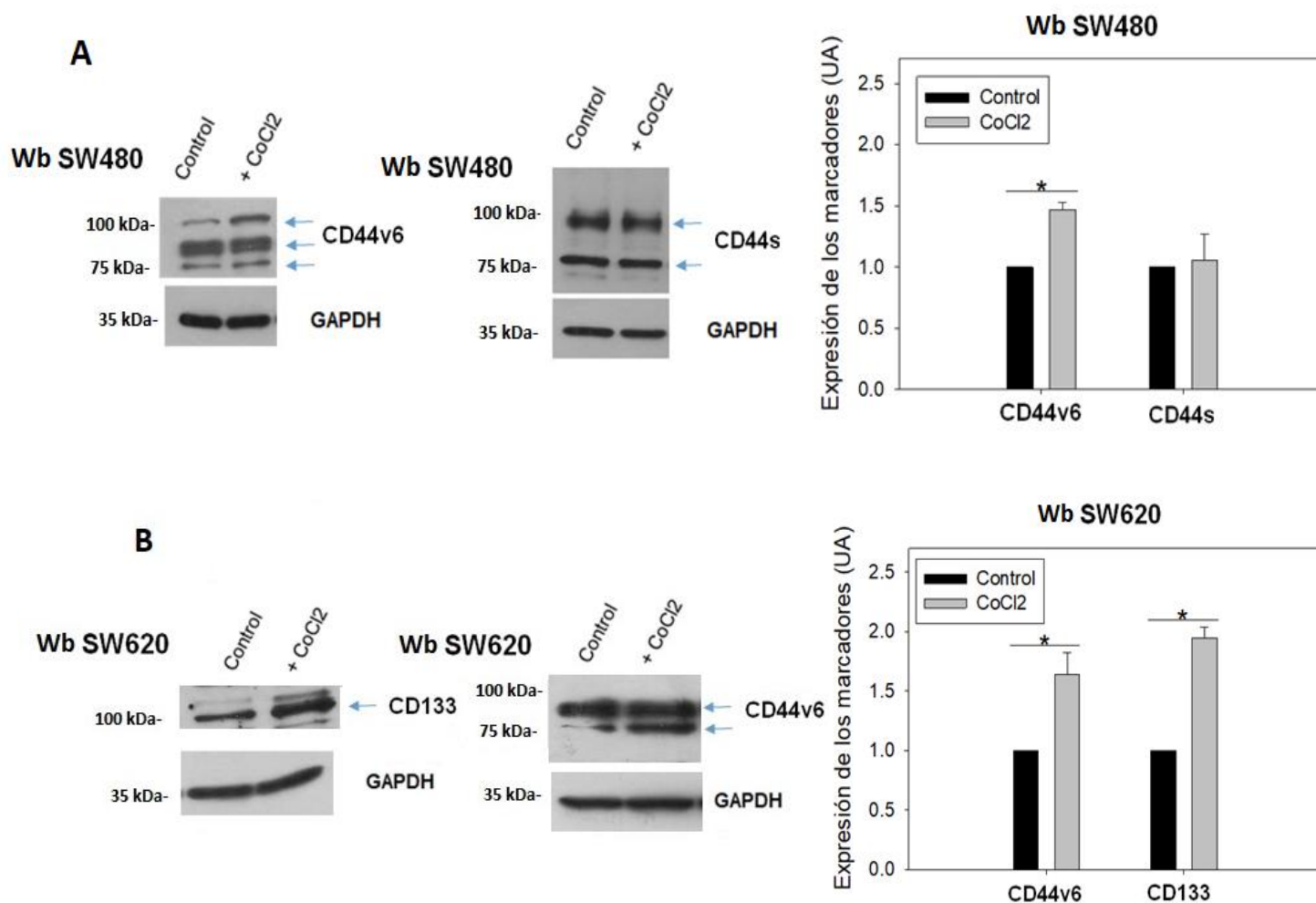


Figura 6. Expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44s y CD44v6 en células de cáncer de colon en hipoxia. (A) Expresión de CD44v6 y CD44s en células SW480 en presencia de 300 μ M de CoCl₂.

(B) Expresión de CD133 y CD44v6 en células SW620 en presencia de 300 μ M CoCl₂. El nivel de expresión en cada caso está expresado como la variación con respecto al cultivo control. Se normalizó la expresión con respecto al control de carga (GAPDH) en cada muestra. Se indica la variación significativa ($p < 0.05$) con (*). Se muestran los pesos moleculares (kDa) y con flechas las bandas proteicas de interés para cada marcador.

Al mimetizar la hipoxia con el uso del cobalto, se registró un aumento significativo en la expresión de CD44v6 en ambas líneas celulares, y de CD133 en las SW620. Estos resultados sugieren que esas condiciones de estrés, que suelen estar presentes en el microambiente tumoral de CC, pueden inducir un incremento en la expresión de marcadores de troncalidad, tal como hipotetizamos.

6.3.2 Estudio del efecto del *knockdown* para HIF-2 α en la expresión de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en células de CC.

Por último, en nuestro trabajo deseamos estudiar el efecto que tendría el *knockdown* de HIF-2 α sobre la expresión de los marcadores evaluados. Los resultados se muestran en la Figura 7.

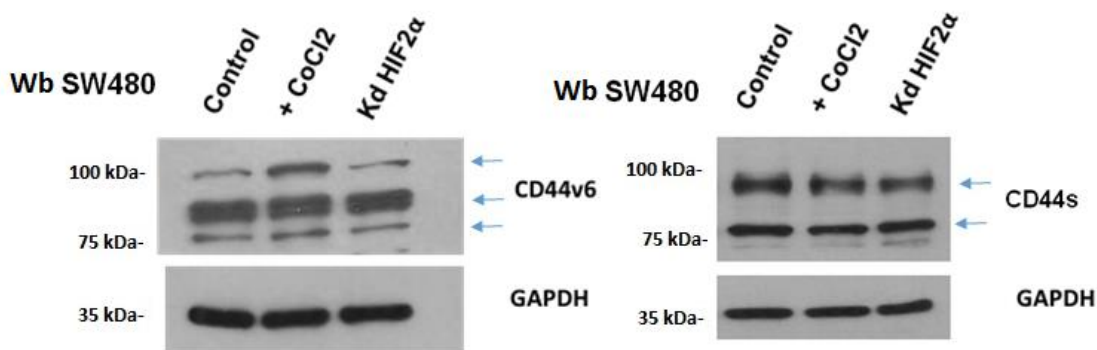


Figura 7. Expresión de CD44v6 y CD44s en células SW480 en presencia de 300 μ M de CoCl₂ y en células *knockdown* para HIF-2 α . Se empleó GAPDH como control de carga. Se muestran los pesos moleculares (kDa) y con flechas las bandas proteicas de interés para cada marcador.

Al disminuirse la expresión de HIF-2 α en cultivos de SW480 no observamos un disminución en la expresión de los marcadores CD44 ni CD44v6, como habíamos hipotetizado. También se realizó el *knockdown* en un cultivo de SW620 y en estas células CD44v6 tampoco disminuyó (datos no mostrados). No obstante, debe tenerse en cuenta que la técnica empleada (Wb) solo nos informa sobre variaciones en el nivel de una cierta proteína presente en el extracto total de las células. No nos permite discriminar sobre cuánta proteína se está expresando a nivel de la membrana citoplasmática, o compartimientos intracelulares. Al tratarse de marcadores de troncalidad que tienen claras importancias funcionales para las células malignas y que suelen hallarse actuando como correceptores para factores de crecimiento e implicados en cascadas de señalización celular, resulta muy relevante evaluar su presencia en la superficie celular, lo cual se recomienda al final

de este trabajo. Hipotetizamos que, como respuesta al *knockdown* de HIF-2 α , podría estarse afectando la localización subcelular de estos marcadores, como su tráfico a la superficie de la célula, aunque se expresen al mismo nivel que en los cultivos control. Otra posible explicación es que HIF-2 α sí ejerza una regulación positiva sobre la expresión de estos marcadores, pero mediante una señalización más compleja, que pudiera compensar los efectos inducidos por la disminución en la cantidad de este HIF.

7. Discusión

Las neoplasias malignas colorrectales, como otros tipos de cáncer, exhiben una gran heterogeneidad inter- e intratumoral que puede observarse, entre otros aspectos, en la expresión diferencial de marcadores de superficie celular. En nuestro estudio se empezó por evaluar los niveles basales de los marcadores de troncalidad CD133, CD44 y CD44v6 en las líneas celulares 112CoN (colon normal fetal), SW480 (adenocarcinoma colorrectal primario) y SW620 (adenocarcinoma de metástasis en nodo linfático derivado del tumor del que se aisló la línea SW480). Los resultados se muestran en la Figura 1. Al analizar la expresión de estas proteínas por Wb, se observó que CD133 se encuentra mayormente expresado en las líneas malignas y con un nivel mayor en la línea SW620, mientras que CD44 predomina en las SW480. CD44v6 tiene una alta expresión en ambas líneas cancerosas, pero más en la línea metastásica. Debido a la variedad de ARNm a que puede dar lugar el gen de CD44 por el proceso postranscripcional de *splicing* alternativo, en nuestros experimentos se observaron varias bandas proteicas de CD44, porque el anticuerpo empleado, dirigido contra un epítipo de la región estándar de la molécula, reconoce a todas las isoformas, tanto las CD44s (que sólo contienen la región estándar) como todas las isoformas con exones variables, que también contienen esa región estándar. Lo mismo sucede con CD44v6: el anticuerpo reconoce a todas las isoformas que contienen al exón variable 6, que pueden ser de diferentes pesos moleculares, de ahí que observáramos varias bandas en el Wb.

Las células 112CoN también expresan estos marcadores, pero en cantidades más restringidas, con la excepción de CD44. Esto puede deberse a que se trata de una línea aislada de colon fetal humano, por tanto, debe estar enriquecida en células multipotentes, además de que estos marcadores han sido reportados en tejidos normales, donde desempeñan importantes funciones. Estos resultados coinciden con los reportados por Wang et al. (2012). Estos autores analizaron la expresión de CD44 y CD133 en varias líneas celulares de CC, entre ellas, las SW480 y SW620. Al evaluar empleando Wb encontraron que ambas líneas expresan CD44, pero mucho más las SW480. Sin embargo, al evaluar por citometría de flujo, que informa sobre la presencia de estos marcadores en la superficie celular, observaron que la línea SW480 (procedente de un estadio más temprano de la enfermedad) es casi completamente CD44(+) (un 95.8 %), mientras que sólo un 0.2 % de células expresan CD133 en su superficie. Por su parte, las SW620 (procedentes de un estadio avanzado de la enfermedad, invasivo) expresan CD133 en alrededor del 60 % de sus células, mientras que sólo el 3.2 % son CD44(+).

CD44 ha sido propuesto como marcador de células troncales en varios tipos de cáncer, como de mama, vejiga, estómago, cuello, hígado, ovario, páncreas, próstata y colon (Zoller, 2011). Se trata de una molécula altamente versátil, polimórfica, pudiendo encontrarse muchísimas isoformas en virtud del proceso de *splicing* alternativo al que se somete su RNAm. Su forma “estándar” (CD44s) se encuentra en muchos tejidos, funcionando como receptor transmembranal ubicuo, implicada en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, así como en el crecimiento celular, el tráfico y también la progresión tumoral (Todaro et al., 2014). Participa

además en la transducción de señales que median la hematopoyesis y la apoptosis (Masuda et al., 1999). En cambio, las isoformas que contienen distintas combinaciones de sus exones variables parecen restringidas a subpoblaciones celulares malignas con características de troncalidad (Todaro et al., 2014). Esto parece particularmente evidente en el epitelio intestinal. Aunque las células del intestino expresan CD44s y CD44v, sólo las isoformas variables promueven la generación de un adenoma en modelos murinos de poliposis adenomatosa familiar (Zeilstra et al., 2014).

Las isoformas de CD44 que contienen al exón variable 6 (CD44v6) han sido propuestas como otros de los principales marcadores de troncalidad en cáncer de colon y en otros tipos de neoplasias. CD44v6 interactúa con el receptor del HGF (MET) en presencia de su ligando y potencia su señalización. En CTC de CC esta señalización promueve la motilidad celular, la invasividad y metástasis (Bánky et al., 2012). En nuestra investigación encontramos un nivel de expresión de CD44v6 mayor en la línea metastásica SW620. Este resultado coincide con lo reportado en el estudio de Todaro et al. (2014), donde registraron mayor expresión de CD44v6 en células provenientes de lesiones metastásicas de pacientes de CC, y menor en tumores primarios y se demostró que este marcador tiene un papel funcional muy relevante para el establecimiento de metástasis de tumores colorrectales.

Posteriormente, nos propusimos estudiar la prevalencia de estos marcadores en células sometidas a estrés nutricional y a hipoxia, así como en células en las que se realizó el *knockdown* de HIF-2 α . Nuestro interés se debe a que, la pobre irrigación sanguínea es una condición fisiológica que frecuentemente se halla en tumores sólidos, como los del colon. Un microambiente isquémico se puede establecer en no pocas áreas del tumor debido al crecimiento y proliferación descontrolados y el mal desarrollo de la vasculatura tumoral. Esta condición implica la privación de nutrientes y también la hipoxia (Song et al., 2011).

Las respuestas celulares a ambas condiciones están orquestadas por los factores de transcripción heterodiméricos inducibles por hipoxia llamados HIFs y está demostrado que estos tipos de estrés vuelven a las células cancerosas más malignas y resistentes a tratamientos (Nagaraju et al., 2015). La capacidad transactivadora de los HIFs sobre gran cantidad de genes blancos, se vuelve aún más relevante si tenemos en cuenta que estos factores también se estabilizan en células malignas mediante vías no dependientes de oxígeno, tal como puede ser por la pérdida de genes supresores de tumores o señalización por factores de crecimiento (Matsumoto et al., 2015). Se ha observado que las células con características de troncalidad promueven el mantenimiento tumoral y la recurrencia, al ser capaces de sobrevivir a tratamientos y a condiciones estresantes que pueden matar a la mayoría de las células de la masa tumoral (Dong et al., 2016). Dada la gran importancia de los HIFs para la adquisición de ventajas adaptativas que permiten a las células sobrevivir y proliferar aún en condiciones de bajo suplemento de nutrientes y de oxígeno, y el aumento en la malignidad que estas condiciones promueven, decidimos evaluar cómo afecta el nivel de expresión de HIF-1 α o HIF-2 α a los marcadores de troncalidad CD133 y CD44v6 en nuestros sistemas celulares.

Para dar cumplimiento a estos objetivos, primero se expusieron cultivos de ambas líneas malignas a estrés nutricional mediante la incubación en solución HBSS por

diferentes períodos de tiempo y procedimos a evaluar los niveles de expresión de los tres marcadores de troncalidad en estas muestras, comparándolos con la expresión de cultivos control. Tal como se muestra en la Figura 3, observamos en las células SW480 un aumento de CD133 y CD44s a las 8 h y 16 h de tratamiento, que en el caso de CD44s siguió aumentando hasta el máximo tiempo medido, 24 h. Las células SW620 exhibieron un aumento significativo de CD133 y CD44v6 a las 8 y 16 h, respectivamente, pero disminución de la expresión de CD44s, como se observa en la Figura 4.

Estos resultados indican que, en la línea derivada de metástasis, CD133 y CD44v6 podrían jugar un papel importante en la supervivencia y resistencia a estas condiciones de estrés. Mientras que, en la línea de tumor primario, son más relevantes CD133 y CD44s en esas condiciones. En este experimento se evaluó la expresión de CD133 en las SW480, a diferencia de los experimentos que siguen, porque en nuestro grupo se observó anteriormente que en estrés nutricional empieza a aparecer una subpoblación CD44(+)/CD133(+) en esa línea y la presencia de ambos marcadores en la superficie celular se confirmó por citometría de flujo. Cabe resaltar que, en general, se registró el aumento de estos marcadores a partir de las 8h y esto coincide con el tiempo al cual se observó un aumento en la expresión de HIF-1 α (Figura 2). Se conoce que HIF-1 α desempeña un papel fundamental en la reprogramación metabólica de células malignas y en su adaptación a la deprivación de nutrientes. Estos marcadores podrían ser blanco de la transactivación por HIF-1 α en las líneas SW480 y SW620. La regulación de CD133 y CD44 por HIF-1 α está reportada en otros tipos de cáncer, así como en CC (Santoyo-Ramos, et al., 2014; Matsumoto et al., 2015).

La compleja respuesta transcripcional que promueven los HIFs, implica la inducción de genes para angiogénesis, metabolismo de glucosa, crecimiento celular, metástasis, apoptosis, remodelación de matriz extracelular, etc (Dong et al., 2016). HIF-1 α está implicado principalmente en la inducción de la ruta glicolítica, mientras que HIF-2 α regula genes importantes para el crecimiento tumoral, progresión del ciclo celular y mantenimiento del estado de troncalidad, como c-Myc y OCT-3/4 (Loboda et al., 2012). No obstante, se ha encontrado que estos factores de transcripción pueden ejercer efectos incluso totalmente opuestos en células cancerosas (Santoyo-Ramos et al., 2014).

Está bien establecida, además, la relación entre la hipoxia y la resistencia a terapias, que es la causa del fallo de los tratamientos y la recurrencia. El microambiente tumoral se caracteriza por marcados gradientes en la tasa de proliferación y por regiones de hipoxia y alta acidez, todos los cuales pueden afectar profundamente la respuesta de los tumores a las terapias (Nagaraju et al., 2015). No obstante, los mecanismos moleculares detrás de la resistencia promovida por los HIFs, son complejos y dependen del tipo tumoral (Rohwer y Cramer, 2011). Está comprobado que HIF-1 α activa la expresión del gen *MDR1*, implicado en la multiresistencia a drogas (Comerford et al., 2002), también altera la apoptosis y puede modular el ciclo celular, así como que suprime la actividad de p53 en respuesta al agente quimioterapéutico 5-FU, entre otros mecanismos. HIF-2 α , por

su parte, se ha encontrado implicado en la promoción de un fenotipo más indiferenciado, al modular positivamente la expresión de factores de troncalidad (Dong et al., 2016).

Para analizar luego el efecto de la hipoxia y del *knockdown* de HIF-2 α sobre la expresión de los marcadores de troncalidad, primero empleamos cultivos de ambas líneas incubados en presencia de CoCl₂, que es un reactivo rutinariamente empleado para mimetizar la condición fisiológica de hipoxia, ya que estabiliza a HIF-1 α y HIF-2 α . Comparamos así la expresión de los marcadores en estos cultivos, con respecto a células control e incorporamos cultivos de SW480 con *knockdown* contra HIF-2 α . En estos últimos la expresión de ese gen se disminuyó mediante transfección con un plásmido pSUPER GFP 2K, que genera un siRNA contra el gen de HIF-2 α , lo cual puede observarse en la Figura 5.

En presencia del CoCl₂, tal como se muestra en la Figura 6, a las 6h, se encontró un aumento de la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α , así que a este tiempo se evaluó la expresión de los marcadores en ambas líneas celulares. En este experimento se observó un aumento significativo en los niveles de CD44s y CD44v6 en las SW480. En el caso de las SW620, como respuesta a la incubación con CoCl₂, un aumento significativo de CD44v6 y CD133. Con estos resultados comprobamos nuestra hipótesis de que la hipoxia promueve el aumento en la expresión de estos marcadores de troncalidad en las líneas celulares empleadas.

Se ha reportado que los efectos ejercidos por HIF-1 α y HIF-2 α son complejos y frecuentemente contrarios. Varios grupos sugieren que éstos ejercen una regulación compleja sobre la expresión de factores proangiogénicos (Florczyk et al., 2011). También se ha enunciado que, los efectos de la expresión de estos HIFs, pueden depender de la actividad de otros factores de transcripción que también se expresen en hipoxia, lo cual sugiere un escenario aún más rico y complicado. Además, tras silenciar a uno de los HIFs, las células hipóxicas podrían detectar la disminución de proteínas de respuesta a hipoxia y compensar este efecto con la regulación positiva de factores de transcripción alternos. Se ha visto que HIF-2 α aumenta la expresión de c-Myc, mientras que HIF-1 α no sólo disminuye su expresión, sino que promueve la producción de un antagonista de este factor (Florczyk et al., 2011). Adicionalmente, HIF-2 α se ha encontrado cooperando con varias oncoproteínas que frecuentemente se hallan desreguladas en el cáncer, como EGFR y KRAS, y está relacionado con una mayor agresividad por inducción de autorenovación y Transición Epitelio-Mesénquima (Koh et al., 2011).

Las diferencias en cuanto a la estabilidad de ambos factores también están descritas. Se conoce que estos dos HIFs se encuentran sujetos a regulación por el Factor Asociado a Hipoxia, el cual es una ubiquitin-ligasa E3 que se une y ubiquitina a HIF-1 α , marcándolo para degradación proteosomal. El Factor Asociado a Hipoxia también se une a HIF-2 α , pero no produce su degradación, sino que aumenta su actividad transactivadora (Endzelins et al., 2018). De este modo, se cambia la

respuesta celular a hipoxia de un mecanismo dependiente de HIF-1 α a uno dependiente de HIF-2 α , que promueve la expresión de genes de MMP y OCT-3/4 (Koh et al., 2011). HIF-1 α es de rápida inducción y está sujeto a una retroalimentación negativa por hipoxia prolongada, por tanto, se encuentra activo sólo en hipoxia aguda. La hipoxia crónica, por otro lado, parece favorecer la expresión de HIF-2 α , en virtud de la afinidad diferencial de este factor por reguladores específicos de la estabilidad de HIFs, como prolilhidroxilasas, factor inhibidor de HIFs, que promueven la ubiquitinación y degradación proteosomal de HIF-1 α , pero no de HIF-2 α (Koh et al., 2011). Dado que la hipoxia crónica es la que se ha asociado con un fenotipo más maligno de células cancerosas, parece ser que HIF-2 α es el que juega un papel más relevante en la supervivencia. Se ha reportado que en CC, el silenciamiento de HIF-2 α redujo la masa del tumor, mientras su sobreexpresión, y no la de HIF-1 α , aumentó el crecimiento maligno, lo cual apoya la idea de que HIF-2 α es el más relevante para la agresividad del tumor (Imamura et al., 2009).

En nuestro grupo con anterioridad se realizó el *knockdown* de HIF-1 α y HIF-2 α en células SW480. El estudio realizado por Santoyo-Ramos et al. (2014) constituye así un antecedente muy importante para este trabajo. Los autores encontraron expresión de HIF-1 α y HIF-2 α en la línea SW480 en condiciones de normoxia, y su mayor inducción al incubarlas en atmósfera de 3% de O₂, lo cual coincide con nuestros resultados, aunque en nuestro caso mimetizamos la hipoxia con CoCl₂. Al evaluar luego la tumorigenicidad de las células de esta línea knockeadas contra HIF-1 α o HIF-2 α , en ratones, observaron una disminución de la capacidad iniciadora de tumor para ambos casos, pero compararon este resultado con el de células de la línea RKO (también de cáncer de colon) y en ese caso sólo el silenciamiento de HIF-2 α produjo disminución en el tamaño tumoral. Los autores explican que esta divergencia probablemente se deba a diferencias en el trasfondo genético de ambas líneas. Al sortear células por la expresión diferencial del marcador CD44, observaron que las células CD44(-) así como las CD44(+), knockeadas contra cualquiera de estos HIFs, prácticamente no formaron tumores en ratones, por tanto, ambos HIFs parecen desempeñar un papel importante para el establecimiento de un tumor *in vivo* a partir de subpoblaciones de la línea SW480, independientemente de su expresión o no de CD44 (Santoyo-Ramos et al., 2014).

Existen trabajos que explican la interacción que existe entre CD44 y HIF-2 α . En el estudio de Johansson et al. (2017), empleando cultivos de células de glioblastoma, demostraron que el dominio intracelular de CD44 es liberado en condiciones de hipoxia, y se une a HIF-2 α , no a HIF-1 α . Mediante esta interacción, promueve la activación de genes blanco de HIF, y se requiere para el mantenimiento de la troncalidad inducida por hipoxia en glioblastoma. El CD44^{ICD} fue suficiente para inducir una señalización hipóxica incluso en condiciones de normoxia. Al bloquearse el corte de CD44, disminuyó la estabilidad de HIF-2 α en las células CD44(+). Estos resultados indican que CD44 modula la respuesta a hipoxia en

células de glioblastoma, así como que, el fenotipo de pseudo-hipoxia que es mantenido por células con características de troncalidad en este tipo de cáncer, se logra por la estabilización de HIF-2 α gracias a su interacción con CD44, de manera independiente de oxígeno. En concordancia con esto, se observó una mayor expresión de CD44 en regiones hipóxicas (Johansson et al., 2017). Otros trabajos han reportado que el dominio intracelular de CD44 contiene una señal de localización nuclear, que promueve su translocación a núcleo y la consecuente modulación transcripcional de varios genes (Lee et al., 2009; Yan et al., 2015). Ese dominio del marcador se ha relacionado con la troncalidad, ya que activa a importantes factores como NANOG, OCT4 y SOX2 (Cho et al., 2015). También se ha observado que la unión de OPN a CD44 media el corte que libera a su dominio intracelular en células de glioma y activa la transcripción dependiente de CBP/p300 (Pietras et al., 2014). Estos datos parecen ubicar a CD44 como causa y no efecto de la activación de HIF-2 α , al menos en algunos tipos de cáncer.

Por último, en nuestro estudio evaluamos el efecto que ejerce el *knockdown* de HIF-2 α sobre la expresión de los marcadores de troncalidad estudiados. Tal como se muestra en la Figura 7, no se encontró disminución en la expresión de CD44 ni de CD44v6 en la línea SW480 al disminuir la expresión de este HIF, contrario a nuestra hipótesis. Este resultado se corresponde con lo observado anteriormente en nuestro grupo por Santoyo-Ramos et al. (2014), quienes registraron incluso un aumento en el nivel proteico de CD44 y Oct4 como consecuencia del *knockdown* de HIF-2 α en las SW480.

Este factor de transcripción podría estar ejerciendo una regulación negativa sobre la expresión de estos marcadores de troncalidad, o quizás una regulación positiva, pero indirecta y compleja. También debe tomarse en cuenta que las células malignas parecen tener mecanismos que les permiten compensar la disminución de un factor de transcripción tan importante como el HIF-2 α . Además, la técnica empleada para detectar estas proteínas, el Wb, no nos brinda información sobre la localización subcelular de esas moléculas, sino solamente de las variaciones en su nivel total de expresión, ya que empleamos extractos totales de las células. Hipotetizamos que, con el *knockdown* de HIF-2 α , podría no estarse afectando la expresión de los marcadores, sino precisamente su tráfico intracelular y su localización en la membrana plasmática. Su presencia en la superficie celular, donde pueden funcionar como correceptores para factores de crecimiento y citocinas, así como promover la activación de vías de señalización, sería un indicador más adecuado que nos informaría de las implicaciones funcionales que tienen las variaciones observadas por Wb en la expresión.

Cabe mencionar que, para poder afirmar que se ha registrado una variación en la cantidad de CTC de un cultivo celular o un tumor como consecuencia de alguna condición impuesta experimentalmente, deben combinarse tres tipos de ensayos: la cuantificación de la fracción de células que expresan los marcadores de troncalidad, la habilidad formadora de tumoroesferas *in vitro* y el análisis de la capacidad

tumorigénica *in vivo* (Velasco-Velázquez et al., 2018). En nuestro estudio se evaluó la expresión de los marcadores de troncalidad por Wb, por tanto, se requiere la realización de ensayos funcionales para poder correlacionar los resultados observados con variaciones reales cuantificables en las subpoblaciones troncales de estos cultivos. De modo que, con este trabajo, se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

8. Conclusiones

1. Expresión de marcadores de troncalidad: Las líneas malignas SW480 y SW620 expresan los tres marcadores de troncalidad evaluados (CD133, CD44 y CD44v6), observándose mayor expresión de CD133 y CD44v6 en la línea metastásica y CD44 en la de tumor primario.

2. Estrés nutricional: El estrés nutricional induce un aumento significativo en los marcadores de troncalidad evaluados en ambas líneas malignas, que se corresponde con una mayor expresión de HIF-1 α , lo cual sugiere que ese factor de transcripción puede modular positivamente la expresión de estos marcadores.

3. Efecto de la hipoxia y el *knockdown* de HIF-2 α : La hipoxia promueve un aumento significativo de los niveles de expresión de los marcadores de troncalidad evaluados en ambas líneas celulares malignas, lo que sugiere que los HIFs pueden promover su expresión. El *knockdown* de HIF-2 α , sin embargo, no indujo disminución en la expresión de estos marcadores, lo que podría indicar que la regulación ejercida por HIF-2 α sobre estas proteínas es más compleja.

9. Perspectivas

Se recomienda continuar con esta línea de trabajo para estudiar la intercomunicación de los HIFs con CD133 y CD44v6 en esas líneas celulares, para dilucidar algunos mecanismos que estén implicados en la promoción de la expresión de marcadores de troncalidad por la hipoxia y el estrés nutricional. Se recomienda, además, comprobar las variaciones aquí descritas, por citometría de flujo.

10. Referencias

- Abbasian, M., Mousavi, E., Arab-Bafrani, Z., et al. (2018). The most reliable surface marker for the identification of colorectal cancer stem-like cells: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.27619
- Afify, A., Durbin-Johnson, B., Viridi, A., et al. (2016). The expression of CD44v6 in colon: from normal to malignant. *Annals of Diagnostic Pathology*, 20, 19–23. doi:10.1016/j.anndiagpath.2015.10.010
- Al-Hajj, M., Wicha, M., Benito-Hernandez, A., et al. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(7), 3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Aoki, K. y Taketo, M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J. Cell Sci*, 120(19), 3327–3335. doi:10.1242/jcs.03485
- Bánky, B., Rásó-Barnet, L., Barbai, T., et al. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Molecular Cancer*, 11(1), 83. doi:10.1186/1476-4598-11-83
- Bardou, M., Barkun, A. y Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933–947. doi:10.1136/gutjnl-2013-304701
- Barker, N., van Es, J., Kuipers, J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. doi:10.1038/nature06196
- Batlle, E. y Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124–1134. doi:10.1038/nm.4409
- Beyaz, S., Mana, M., Roper, J., et al. (2016). High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature*, 531(7592), 53–58. doi:10.1038/nature17173
- Brocardo, M. y Henderson, S. (2009). APC shuttling to the membrane, nucleus, and beyond. *Trends Cell Biol*, 18(12), 587–596. doi:10.1016/j.tcb.2008.09.002
- Cairns, R., Harris, I. y Mak, T. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, 11, 85–95 doi:10.1038/nrc2981
- Carmeliet, P. y Jain, R. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. doi:10.1038/35025220
- Carmon, K., Gong, X., Lin, Q., et al (2011). R- spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta- catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11452–11457. doi:10.1073/pnas.1106083108

Chan, T., Zhao, W., Leung, S., et al. (2003). *BRAF* and *KRAS* mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res*, 63, 4878–81

Chen, K., Pan, F., Jiang, H., et al. (2011). Highly enriched CD133(+)CD44(+) stem-like cells with CD133(+)CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 28(8), 751–763. doi:10.1007/s10585-011-9407-7

Cho, Y., Lee, H., Kang, H., et al. (2015). Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget*, 6(11), 8709-8721.

Choudhry, H. y Harris, A. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metabolism*, 27(2), 281–298. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.005

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3), 313–319. doi:10.1038/nm.2304

Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell*, 154(2), 274–284. doi:10.1016/j.cell.2013.07.004

Collins, A., Berry, P., Hyde, C., et al. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 65(23), 10946–10951. doi:10.1158/0008-5472.can-05-2018

Comerford, K., Wallace, T., Karhausen, J., et al. (2002) Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*, 62, 3387–3394.

Costa, S., Terzano, P., Bovicelli, A., et al. (2001). CD44 isoform 6 (CD44v6) is a prognostic indicator of the response to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 80(1), 67–73. doi:10.1006/gyno.2000.6016

Dalerba, P., Dylla, S., Park, I., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10158–10163. doi:10.1073/pnas.0703478104

Dalerba, P., Kalisky, T., Sahoo, D., et al. (2011). Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat. Biotechnol.* 29(12), 1120–1127. doi:10.1038/nbt.2038

De la Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 769–780. doi:10.1038/nrc1453

De Sousa E Melo, F., Vermeulen, L., Fessler, E., et al. (2013a). Cancer heterogeneity—a multifaceted view. *EMBO Reports*, 14(8), 686–695. doi:10.1038/embor.2013.92

Denko, N. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 705–713. doi:10.1038/nrc2468

Dick, J., Lapidot, T. y Pflumio, F. (1991). Transplantation of Normal and Leukemic Human Bone Marrow into Immune-Deficient Mice: Development of Animal Models for Human Hematopoiesis. *Immunological Reviews*, 124(1), 25–43. doi:10.1111/j.1600-065x.1991.tb00614.x

Dodd, K., Yang, J., Shen, M., et al. (2015). mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* 34, 2239–2250. doi:10.1038/onc.2014.164

Dong, H., Jang, G., Lee, H., et al. (2016). The Wnt/ β -catenin signaling/I δ 2 cascade mediates the effects of hypoxia on the hierarchy of colorectal-cancer stem cells. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep22966

Drost, J., van Jaarsveld, R., Ponsioen, B., et al. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521(7550), 43–47. doi:10.1038/nature14415

Du, L., Wang, H., He, L., et al. (2008). CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6751–6760. doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-1034

Eaton, C., Colombel, M., Van der Pluming, G., et al. (2010). Evaluation of the frequency of putative prostate cancer stem cells in primary and metastatic prostate cancer. *The Prostate*, 70, 875-82. doi:10.1002/pros.21121

Endzelins, E., Abols, A., Buss, A., et al. (2018). Extracellular Vesicles Derived from Hypoxic Colorectal Cancer Cells Confer Metastatic Phenotype to Non-metastatic Cancer Cells. *Anticancer Research*, 38(9), 5139–5147. doi:10.21873/anticancer.12836

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., et al. (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

Ezashi, T., Das, P. y Roberts, R. (2005) Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4783–4788. doi: 10.1073/

Fargeas, C., Joester, A., Missol-Kolka, E., et al. (2004). Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci*, 117(18), 4301–4311. doi:10.1242/jcs.01315 117:4301–4311.

Fearon, E. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 479–507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235

Fearon, E. y Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i

Florczyk, U., Czauderna, S., Stachurska et al. (2011). Opposite effects of HIF-1 α and HIF-2 α on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(10), 1882–1892. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.023

Flossmann, E. y Rothwell, P. (2007). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomized and observational studies. *The Lancet*, 369(9573), 1603–1613. doi:10.1016/s0140-6736(07)60747-8

Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., et al. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30(11), 1845–1855. doi:10.1002/elps.200800720

Gehart, H. y Clevers, H. (2018). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. doi:10.1038/s41575-018-0081-y

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. doi:10.1038/nm.3967

Harradine, K. y Akhurst, R. (2006). Mutations of TGF β signaling molecules in human disease. *Ann. Med*, 38(6), 403–414. doi:10.1080/07853890600919911

Hermann, P., Huber, S., Herrler, T., et al. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1(3), 313–323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002

Hitosugi, T., Kang, S., Vander-Heiden, M., et al. (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci. Signal.* 2, ra73 doi:10.1126/scisignal.2000431

Ho, J., de Moura, M., Lin, Y., et al. (2012). Importance of glycolysis and oxidative phosphorylation in advanced melanoma. *Mol. Cancer* 11, 76. doi:10.1186/1476-4598-11-76

Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., et al. (2009). Prognostic Significance of the Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, and CD166 in Colorectal Cancer. *Cancer Investigation*, 27(8), 844–850. doi:10.1080/07357900902744502

Hou, Y., Zou, Q. y Ge, R. (2012). The critical role of CD133(+)/CD44(+high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res*, 22(1), 259–272. doi:10.1038/cr.2011.139

- Hu, Y. y Smyth, G. (2009) ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods*, 347(1-2), 70–78. doi:10.1016/j.jim.2009.06.008
- Huang, X., Sheng, Y. y Guan, M. (2012). Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol*, 21(2), 103–107. doi:10.1016/j.suronc.2011.06.001
- Imamura, T., Kikuchi, H., Herraiz, M., et al. (2009). HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer. *International Journal of Cancer*, 124(4), 763–771. doi:10.1002/ijc.24032
- Immervoll, H., Hoem, P., Sakariassen, O., et al. (2008). Expression of the “stem cell marker” CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 8(1). doi:10.1186/1471-2407-8-48
- Jemal, A., Center, M., De Santis, C., et al. (2010) Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8), 1893–1907. doi:10.1158/1055-9965.epi-10-0437
- Jeon, J., Du, M., Schoen, R., et al. (2018). Determining Risk of Colorectal Cancer and Starting Age of Screening Based on Lifestyle, Environmental, and Genetic Factors. *Gastroenterology*, 154(8), 2152–2164.e19. doi:10.1053/j.gastro.2018.02.021
- Johansson, E., Grassi, E., Pantazopoulou, V., et al. (2017). CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Reports*, 20(7), 1641–1653. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.049
- Kim, W. y Ryu, C. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Reports*, 50(6), 285–298. doi:10.5483/bmbrep.2017.50.6.039
- Kinzler, K. y Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. doi:10.1016/s0092-8674(00)81333-1
- Koh, M., Lemos, R., Liu, X., et al. (2011). The Hypoxia-Associated Factor Switches Cells from HIF-1 - to HIF-2 -Dependent Signaling Promoting Stem Cell Characteristics, Aggressive Tumor Growth and Invasion. *Cancer Research*, 71(11), 4015–4027. doi:10.1158/0008-5472.can-10-4142
- Konishi, H., Asano, N. e Imatani, A. (2016). Notch1 directly induced CD133 expression in human diffuse type gastric cancers. *Oncotarget*, 7, 56598-56607
- Kreso, A. y Dick, J. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275–291. doi:10.1016/j.stem.2014.02.006

Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., et al. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, 63, 1138–1143.

Lee, J., Wang, J. y Chen, J. (2009). Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol*, 185(6): 949-957.

Leedham, S., Rodenas-Cuadrado, P., Howarth, K, et al. (2013). A basal gradient of Wnt and stem-cell number influences regional tumour distribution in human and mouse intestinal tracts. *Gut*, 62(1), 83–93. doi:10.1136/gutjnl-2011-301601

Levine, A. y Puzio-Kuter, A. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340–1344 doi:10.1126/science.1193494

Li, C., Heidt, D., Dalerba, P., et al. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. doi:10.1158/0008-5472.can-06-2030

Li, X., Nadauld, L., Ootani, A., et al. (2014). Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nature Medicine*, 20(7), 769–777. doi:10.1038/nm.3585

Lin, L., Liu, H., Dong, S., et al. (2016). Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumor Biology*, 37(7), 8811–8824. doi:10.1007/s13277-015-4755-6

Lin, Q. y Yun, Z. (2010). Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. *Cancer Biology & Therapy*, 9(12), 949–956. doi:10.4161/cbt.9.12.12347

Liou, G. (2019). CD133 as a Regulator of Cancer Metastasis through the Cancer Stem Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. doi:10.1016/j.biocel.2018.10.013

Loboda, A., Jozkowicz, A. y Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2 — Is one more important than the other? *Vascular Pharmacology*, 56(5-6), 245–251. doi:10.1016/j.vph.2012.02.006

Luna-Ulloa, L., Hernandez-Maqueda, J., Santoyo-Ramos, P., et al. (2011). Protein kinase C is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis*, 32(11), 1615–1624. doi:10.1093/carcin/bgr190

Mak, A., Nixon, A. y Kittana, S. (2012). Regulation of CD133 by HDAC6 promotes beta-catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep*, 2(4), 951–963. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.016

Marshman, E., Booth, C. y Potten, C. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 24(1), 91–98. doi:10.1002/bies.10028

Masuda, M., Takano, Y., Iki, M., et al. (1999). Expression and prognostic value of CD44 isoforms in transition cell carcinoma of renal pelvis and ureter. *J Urol* 161:805–808. doi: 10.1016/S0022-5347(01)61775-0

Matsumoto, K., Okuzo, A. Kaoru, T., et al. (2015) mTOR Signal and Hypoxia-Inducible Factor-1A Regulate CD133 Expression in Cancer Cells. *Cancer Res*, 69(18), 7160–7164. doi:10.1158/0008-5472.can-09-1289

Medema, J. y Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318–326. doi:10.1038/nature10212

Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A., et al. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013–5021.

Motohara, T., Masuko, S., Ishimoto, T., et al. (2011). Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis*, 32(11), 1597–1606. doi:10.1093/carcin/bgr183

Nagaraju, G., Bramhachari, P., Raghu, G., et al. (2015) Hypoxia inducible factor- 1 α : Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis. *Cancer Letters*, 366(1), 11–18. doi:10.1016/j.canlet.2015.06.005

Nam, K., Sunhwa, O. y S, E. (2016). Ablation of CD44 induces glycolysis-to-oxidative phosphorylation transition via modulation of the c-Src–Akt–LKB1–AMPK α pathway *Biochemical Journal*, 473, 3013–3030. doi: 10.1042/BCJ20160613.

Ni, J., Cozzi, P., Hao, J., et al., (2014) CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/ radioresistance. *The Prostate*, 74(6), 602–617. doi:10.1002/pros.22775

O'Brien, C., Pollett, A., Gallinger, S., et al. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106–110. doi:10.1038/nature05372

Orian-Rousseau, V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *European Journal of Cancer*, 46(7), 1271–1277. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.024

Orian-Rousseau, V. (2015). CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in Immunology*, 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00154

Park, E., Lee, J., Park, J., et al. (2015). Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis*, 6(11), e1964–e1964. doi:10.1038/cddis.2015.313

Philip, B., Ito, K., Moreno-Sanchez, R., et al. (2013). HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. *Carcinogenesis*, 34(8), 1699–1707. doi:10.1093/carcin/bgt209

Pietras, A., Katz, E., Ekstrom, J., et al. (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

Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 17(1), 45–51. doi:10.1016/j.gde.2006.12.007

Pretlow, T. y Pretlow, T. (2005). Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of colorectal cancer? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1756(2), 83–96. doi:10.1016/j.bbcan.2005.06.002

Qiu, G., Jin, M., Dai, J., et al. (2017). Reprogramming of the Tumor in the Hypoxic Niche: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(8), 669–686. doi:10.1016/j.tips.2017.05.002

Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., et al. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418(6901), 934–934. doi:10.1038/418934a

Read, R. y Kodner, I. (1999). Colorectal cancer: risks factors and recommendations for early detection. *Am Fam Physician*, 59(11),3083-3092.

Reynoso-Noverón N y Torres-Domínguez J. (2018) Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8 (1), 9-15.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D., Pilozzi, E., et al. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. doi:10.1038/nature05384

Ritsma, L., Ellenbroek, S., Zomer, A., et al. (2014). Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature*, 507(7492), 362–365. doi:10.1038/nature12972

Rodríguez BM. (2003). Adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer Medicine*, 2, 1635-44.

Rohwer, N. y Cramer, T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resistance Updates*, 14(3), 191–201. doi:10.1016/j.drup.2011.03.001

Sahlberg, S., Spiegelberg, D., Glimelius, B., et al. (2014). Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(4), e94621. doi:10.1371/journal.pone.0094621

Santoyo-Ramos, P., Likhatcheva, M., García-Zepeda et al. (2014). Hypoxia-Inducible Factors Modulate the Stemness and Malignancy of Colon Cancer Cells by Playing Opposite Roles in Canonical Wnt Signaling. *PLoS ONE*, 9(11), e112580. doi:10.1371/journal.pone.0112580

Schneider, M., Huber, J., Hadaschik, B., et al. (2012). Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer*, 12(1). doi:10.1186/1471-2407-12-96

Schulze, A. y Harris, A. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491(7424), 364–373. doi:10.1038/nature11706

Semenza, G. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721–732. doi:10.1038/nrc1187

Semenza, G. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 20, 51–56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009

Semenza, G. (2016). Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *The EMBO Journal*, 36(3), 252–259. doi:10.15252/embj.201695204

Shepherd, C., Rizzo, S., Ledaki, M., et al. (2008). Expression profiling of CD133+ and CD133- epithelial cells from human prostate. *Prostate* 68(9), 1007–1024. doi:10.1002/pros.20765

Shmelkov, S., Butler, J., Hooper, A., et al. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2111-2120. doi:10.1172/JCI34401.

Siegel, R., Miller, K. y Jemal, A. (2015) Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5–29. doi:10.3322/caac.21254

Singh, S., Hawkins, C., Clarke, I., et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, 396–401. doi:10.1038/nature03128

Slattery, M. y Fitzpatrick, F. (2009). Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology. *Cancer Prev. Res*, 2(11), 922–930. doi:10.1158/1940-6207.capr-08-0191 2:922–30

Song, J., Guo, X., Wei, L., et al. (2011). Autophagy in hypoxia protects cancer cells against apoptosis induced by nutrient deprivation through a beclin1-dependent way in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(11), 3406–3420. doi:10.1002/jcb.23274

Steinbach, G., Lynch, P. y Phillips R. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase inhibitor on familial adenomatous polyposis. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1946–1952. doi:10.1056/nejm200006293422603

Su, Y., Lai, H., Chang, Y., et al. (2011). Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *The EMBO Journal*, 30(15), 3186–3199. doi:10.1038/emboj.2011.211

Sullivan, R., Pare, G., Frederiksen, L., et al. (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1961–1973. doi:10.1158/1535-7163.mct-08-0198

Tamada, M., Nagano, O., Tateyama, S., et al. (2012). Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res*, 72, 1438–1448 doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3024

Tang, Y., Chen, Y., Bao, Y., et al. (2018). Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), E5990–E5999. doi:10.1073/pnas.1801348115

Till, J. y McCulloch, E. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, 14(2), 213. doi:10.2307/3570892

Tinkum, K., Stemler, K., White, L., et al. (2015). Fasting protects mice from lethal DNA damage by promoting small intestinal epithelial stem cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E7148–E7154. doi:10.1073/pnas.1509249112

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., et al. (2014) CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*, 14(3), 342–356. doi:10.1016/j.stem.2014.01.009

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., et al. (2014). CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell*, 14(3), 342–356. doi:10.1016/j.stem.2014.01.009

Uchida, N., Buck, W., He, D., et al. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(26), 14720–14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720

Vadde, R., Vemula, S., Jinka, R., et al (2017). Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.02.025

Vadde, R., Vemula, S., Jinka, R., et al. (2017). Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 113, 22–27. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.02.025

Vaiopoulos, A., Kostakis, I., Koutsilieris, M., et al. (2012). Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells*, 30(3), 363–371. doi:10.1002/stem.1031

Vander-Heiden, M., Cantley, L. y Thompson, C. (2009.) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033 doi:10.1126/science.1160809

Vaupel, P. y Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 225–239. doi:10.1007/s10555-007-9055-1

Velasco-Velázquez, M., Velázquez-Quesada, I. y Vásquez-Bochm, L. (2018). Targeting Breast Cancer Stem Cells: A Methodological Perspective. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(00). doi: 10.2174/1574888X13666180821155701

Velázquez, D., Castañeda-Patlán, M. y Robles-Flores, M. (2017). Dishevelled stability is positively regulated by PKC ζ -mediated phosphorylation induced by Wnt agonists. *Cellular Signalling*, 35, 107–117. doi:10.1016/j.cellsig.2017.03.023

Vousden, K. y Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413–431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037

Wakamatsu Y., Sakamoto, N. y Naito, Y. (2012). Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*, 62(2), 112–119. doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02760.x

Wang, C., Xie, J., Guo, J., et al. (2012). Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncology Reports*, 28(4), 1301–1308. doi:10.3892/or.2012.1951

Wang, S., Wong, G., Heer, A., et al. (2009) CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *The Laryngoscope*, 119(8), 1518–1530. doi:10.1002/lary.20506

Wirtzfeld, D., Petrelli, N. y Rodríguez- Bigas, M. (2001). Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Annals of Surgical Oncology*, 8(4), 319–327. doi:10.1007/s10434-001-0319-7

- Wohlleben, G., Hauff, K., Gasser, M., et al. (2017). Hypoxia induces differential expression patterns of osteopontin and CD44 in colorectal carcinoma. *Oncology Reports*. doi:10.3892/or.2017.6068
- Won, C., Kim, B., Yi, E., et al. (2015). Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 62(4), 1160–1173. doi:10.1002/hep.27968
- Wu, C., Wei, Q., Utomo, V., et al. (2007). Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res*, 67(17), 8216–8222. doi:10.1158/0008-5472.can-07-0999
- Wu, D. y Yotnda, P (2011). Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *J. Vis. Exp.* (54), e2899, doi: 10.3791/2899 (2011).
- Wu, L., Yu, H., Zhao, Y., et al. (2015). HIF-2alpha mediates hypoxia induced LIF expression in human colorectal cancer cells. *Oncotarget.*, 6, 4406-17.
- Wu, Y. y Wu, P. (2009). CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells and Development*, 18(8), 1127–1134. doi:10.1089/scd.2008.0338
- Yan, Y., Zuo, X. y Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(9), 1033–1043. doi:10.5966/sctm.2015-0048
- Yilmaz, H., Katajisto, P., Lamming, D., et al. (2012). mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, 486(7404), 490–495. doi:10.1038/nature11163
- Yin, A., Miraglia, S., Zanjani, E., et al. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90 (12), 5002–5012.
- Zeilstra, J., Joosten, S., van Andel, H., et al. (2013). Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene*, 33(5), 665–670. doi:10.1038/onc.2012.611
- Zeilstra, J., Joosten, S., Vermeulen, L., et al. (2013). CD44 Expression in Intestinal Epithelium and Colorectal Cancer Is Independent of p53 Status. *PLoS ONE*, 8(8), e72849. doi:10.1371/journal.pone.0072849
- Zeuner, A., Todaro, M., Stassi, G., et al. (2014). Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic. *Cell Stem Cell*, 15(6), 692–705. doi:10.1016/j.stem.2014.11.012

Zhang, B., Halder, S., Kashikar, N., et al. (2010). Antimetastatic Role of Smad4 Signaling in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(3), 969–980.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.004

Zhou, J., Chen, M., Ma, L., et al. (2016). Role of CD44^{high}/CD133^{high} HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*, 7(7). doi:10.18632/oncotarget.7084

Zoller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 254–267. doi:10.1038/nrc3023