



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Facultad de Química
Instituto Nacional de Cancerología

ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE RESPUESTA A DAÑO AL ADN EN CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS OBTENIDAS DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Heriberto Abraham Valencia González

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alejandro García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Antonieta Chávez González
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS

Dr. Emilio Rojas del Castillo
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, 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.



PMDCB/713/2019

Valencia González Heriberto Abraham
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 11 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Activación de la vía de respuesta a daño al ADN en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas obtenidas de líneas celulares de cáncer**", dirigida por el/la Dr(a). **García Carrancá Alejandro Manuel**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Velasco Velázquez Jaime Iván
VOCAL	Montesinos Montesinos Juan José
VOCAL	Salazar Martínez Ana María
VOCAL	Lizano Soberón Marcela
SECRETARIO	Rocha Zavaleta Leticia

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de febrero de 2019.
COORDINADORA

Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel.: 5623 7006

Dedicatoria

A mis amados padres:

Abel Valencia Cedillo

María Teresa González Valverde

A mis queridos hermanos:

Angel Abel

Gisela

Miriam Jacqueline

Briaam Gilberto

Eduardo Erasmo

A todo paciente oncológico de cualquier parte del mundo que ha logrado superar el cáncer, se está enfrentando a él o que ha muerto a pesar de los avances médicos y tecnológico para curarlo.

“No estudio para saber más, si no para desconocer menos”

Sor Juana Inés de la Cruz, 1648 – 1695

“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido.
Ahora es momento de comprender más para que podamos temer menos”

Marie Curie, 1867 – 1934

ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE RESPUESTA A DAÑO AL ADN EN CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS OBTENIDAS DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá, jefe del Laboratorio de Investigación 9 “Virus y Cáncer” de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se reconoce y agradece el apoyo de las unidades de servicio del IIB-UNAM:

Unidad de Microscopía, con asesoría del Dr. Miguel Tapia Rodríguez.

Unidad de Radiación, con asesoría del QFB. Carlos Castellanos Barba.

Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo.

Laboratorio de Carcinogénesis, UNAM-INCan

Se reconoce y agradece la asesoría y soporte técnico de:

M. en C. Miriam C. Guido Jiménez Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Dra. Graciela Ruiz Ramírez CINVESTAV

Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Francisco Gallardo-Vera Facultad de Medicina UNAM

Durante los estudios de doctorado se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con CVU/Becario 345455/240105, con un apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado para asistir al congreso internacional *Keystone Symposia meeting on Stem Cells and Cancer* en marzo de 2016, con el apoyo de ayudante de investigación No. 16800 y con un apoyo del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología con No. 19BTD0030 para la titulación. Así mismo, el trabajo fue financiado como parte del proyecto CONACYT No. CB-2015/253804 y la Fundación Miguel Alemán A.C. para el Dr. Alejandro García Carrancá.

Agradecimientos

Antes que nada, deseo agradecer a Dios por permitirme culminar este reto que en algún momento parecía insuperable, pero todo el tiempo que invertí en él ha retribuido con mucho aprendizaje.

Agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme emprender esta aventura en las instalaciones de su Facultad de Química y principalmente en las de su Instituto de Investigaciones Biomédicas, así como al gran Instituto Nacional de Cancerología en el Laboratorio de Investigación 9 “Virus y Cáncer”, lugares en donde el conocimiento que se genera cambia al mundo.

También expreso mi más profundo agradecimiento:

Al Dr. Alejandro García Carrancá, quién dirigió el trabajo, porque me ha dado la oportunidad de incursionar en diversas áreas del conocimiento, por la confianza para dejarme tomar decisiones de manera autónoma, por su paciencia, por su siempre disposición para asesorarme cuando yo lo requería y sobre todo por su alegría contagiosa. Muchas gracias doctor.

A Grace Ruiz, que nos conocemos desde la maestría, por su tenacidad para que yo fuera siempre una mejor persona cada vez. Gracias a ella, el trabajo salió adelante. Por su amistad, su tiempo personal y laboral, porque tuvo las herramientas para poder animarme y sacarme a flote en diversas ocasiones. También porque con ella aprendí, además de los temas de ciencia, muchos otros que han influenciado mucho en mi forma de ser. Muchas gracias por todo.

A mis queridos amigos Luz Valerio y Mike Sarabia, por su amistad incondicional, con quienes, además del trabajo en el laboratorio, compartí grandes aventuras académicas, deportivas y sociales. Porque con cada risa y experiencias que hemos tenido juntos caminando, trotando o corriendo, se han convertido en parte de mi familia. Por el apoyo y los consejos para superar la adversidad, estando cerca o a la distancia. Me siento muy afortunado de contar y crecer con ellos; muchas gracias, de verdad, muchas gracias.

A Silvia Maldonado, porque con su entusiasmo, experiencia y severidad, lograba encaminar mis decisiones en la última etapa de esta historia. Porque siempre tuvo un consejo, palabras de aliento e incluso de llamadas de atención para siempre hacer lo correcto y seguir adelante con humildad y respeto. Porque con ella, la mejora siempre es continua y la calidad no solo es un punto de la norma, sino un “deber ser” del trabajo en la ciencia.

A mis muy buenos amigos de hace tiempo, Samuel Romero, Dianita López, Yuri Jacobo-Cruz, por su apoyo y entusiasmo que fueron siempre motivantes para seguir adelante. Los retos deportivos, las pláticas académicas, las conversaciones y demás actividades con ellos fueron, son y seguirán sido de excelencia.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de “Virus y Cáncer” con quienes sufrí y disfruté horas y horas de trabajo: Karen de la Cruz, Vero Antonio, Jackie López, Pedro Chalma, Gabriele Bigoni. Así como a quienes compartieron conmigo tiempo y espacio recordables: Gaby Toledo, Erika García, Mitzli López, Wendy Baez, Silvia Galvan, Adriana Grijalva, Leny Díaz, Mariel Toledo, Helga López, Brenda López, Itzel Castillejos, Marisol Salgado, **Selik Arturo Camacho Aguilar †**, Eduardo Alvarado, Vincent Osnaya, Marco Meraz, Germán Villanueva, Greco Hernández, Angel Gómez.

A los dirigentes del Laboratorio de “Virus y Cáncer”, el Dr. Alejandro García Carrancá, Elizabeth Ortiz, Miriam Guido y Rocio Méndez, por brindarme la oportunidad de contribuir en las actividades y responsabilidades del laboratorio. Ahora logro ver el desafío al que uno se enfrenta para dirigir, mantener y hacer prosperar un grupo de trabajo dedicado a la investigación científica.

A Gilberto Valencia y a Jesús Espinosa por ser mis primeros alumnos de licenciatura en graduar; y al Tecnológico de Estudios Superiores de Chimalhuacán por confiar en mi para que ellos pudieran culminar sus estudios y logran obtener su grado universitario. De verdad, muchas gracias.

También deseo agradecer a quienes, con su amistad, sus opiniones, ideas y expectativas acerca de lo que implica realizar un doctorado, reforzaban mi entusiasmo y alegría por trabajar en el laboratorio, Raquel López, Mauricio Orozco, Karla Zaragoza, Araceli Escalera, Blanca Cruz, Brenda Hernández, Patricia Hernández, Alejandra Zaragoza.

A Martha Sánchez, porque desde que iniciamos la maestría juntos siempre logramos empatar una amistad sincera y de apoyo mutuo. Porque es una persona muy importante en mi vida y que seguirá en mi mente a pesar de la distancia; es lindo saber que ella existe, a pesar de que casi es ley que los amores eternos sean los más breves.

Es muy difícil poder mencionar a todos los que han contribuido con algo, perdonarán la omisión, pero realmente se les agradece.

Y, por último, y no por eso menos importante, a mi amada familia, por apoyarme en cada decisión he tomado y que seguiré tomando, buena o mala. Si bien el camino ha sido largo hasta ahora, agradezco su paciencia, su amor, sus aportes, sus sacrificios y su infinita confianza para culminar este proyecto, que estoy seguro, celebran igual o más que yo; porque también este es un logro de ellos. Estoy en deuda con ellos de por vida.

ÍNDICE	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. CÁNCER Y CÉLULAS TRONCALES	3
3.1.1. Células troncales normales	6
3.1.2. Células troncales cancerosas	9
3.2. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS	11
3.2.1. Ensayo de formación de esferas	11
3.2.2. Marcadores de células troncales cancerosas	14
a) Integrina CD49f	14
b) Enzima ALDH	15
3.3. DAÑO AL ADN	16
3.3.1. Radiación ionizante	17
3.3.2. Vía de Respuesta a Daño al ADN	19
a) Proteína Ataxia Telangiectasia Mutada	23
b) Variante X de la histona 2A	24
c) Proteína Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	28
6.1. GENERAL	28
6.2. PARTICULARES	28
7. METODOLOGÍA	29
7.1. CULTIVOS CELULARES	29
7.1.1. Cultivos en monocapa	29
7.1.2. Cultivos de esferas	29
7.2. IDENTIFICACIÓN DE CD49f Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALDH	30
7.3. EXPOSICIÓN A RADIACIÓN IONIZANTE	31

7.4.	DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOBREVIVIENTE A IR.....	31
7.5.	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	32
7.6.	INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT.....	32
7.7.	INMUNOFLUORESCENCIA.....	33
7.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33
8.	RESULTADOS.....	34
8.1.	LOS CULTIVOS DE ESFERAS SE ENCUENTRAN ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	34
8.2.	LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS MUESTRAN MENOS SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE.....	34
8.3.	LOS CULTIVOS DE ESFERAS Y MONOCAPA DETIENEN DEL CICLO CELULAR EN TIEMPOS SIMILARES DESPUES DE LA EXPOSICIÓN A IR.....	37
8.4.	ATM Y PARP1 PERMANECEN ACTIVAS EN LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CSC DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A IR.....	38
8.5.	LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CSC TIENEN ACTIVA LA VÍA DE RESPUESTA A DAÑO AL ADN.....	41
9.	DISCUSIÓN.....	44
10.	CONCLUSIONES.....	49
11.	PERSPECTIVAS.....	49
12.	REFERENCIAS.....	50
13.	ANEXO. ARTÍCULO ORIGINAL.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer por sitio anatómico a nivel mundial	4
Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer por sitio anatómico en México.....	5
Figura 3. Diferenciación celular en base al modelo jerárquico.....	7
Figura 4. Las células troncales cancerosas en el tumor.....	10
Figura 5. Ensayo de formación de esferas.....	13
Figura 6. Vía de respuesta a daño al ADN (DDR).....	20
Figura 7. Sensado de la ruptura de cadena doble.....	22
Figura 8. Los cultivos de esferas se enriquecen en CSC de HeLa.....	35
Figura 9. Los cultivos de esferas de HeLa son menos sensibles a la radiación ionizante.....	36
Figura 10. Los cultivos de esferas y monocapa detienen el ciclo celular en tiempos similares	37
Figura 11. El nivel de expresión de ATM y pATM es mayor en los cultivos enriquecidos en CSC.....	39
Figura 12. El nivel de expresión de cPARP1 es mayor en los cultivos enriquecidos en CSC.....	40
Figura 13. La presencia de pATM y γH2A.X indica que la vía DDR se encuentra activa en loc cultivos enriquecidos en CSC.....	42
Figura 14. Los cultivos de esferas de MCF-7 son menos sensibles a la IR.....	43

Tabla de siglas

Siglas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Enzima Aldehído deshidrogenasa
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
BSA	Albúmina sérica bovina
CD49f	Nombre de la subunidad alfa tipo 6 de una integrina transmembranal en una célula
cPARP1	Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1 cortada
CSC	Células troncales cancerosas, por las siglas en inglés de <i>cancer stem cells</i>
DDR	Respuesta al daño en el ADN del inglés <i>DNA Damage Response</i>
DEAB	Dietilaminobenzaldehído
DIR	Dosis de radiación ionizante
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco de <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM F-12	Medio constituido en una proporción 1:1 de medio DMEM y medio Ham's F-12
DSB	Ruptura de cadena doble del inglés <i>Double Strand Break</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Eficiencia de plaqueo
Gy	Unidad para medir la dosis de radiación absorbida
H2A.X	Variante de la histona H2A
IR	Radiación ionizante
LD50	Dosis letal media
LET	Transferencia lineal de energía del inglés <i>Linear Energy Transfer</i>
MEC	Matriz extracelular

ML	Cultivo en monocapa
PARP1	Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1
pATM	ATM fosforilada en la serina 1981
PBS	Solución salina de fosfatos amortiguada
SF	Fracción sobreviviente
SFB	Suero Fetal Bovino
SP	Cultivo de esferas
γ H2A.X	H2A.X fosforilada en la serina 139

1. RESUMEN

Recientemente, se ha caracterizado una subpoblación de células tumorales, denominadas células troncales cancerosas (CSC), volviéndose un eje importante en la investigación sobre el cáncer. Se propone que las CSC reparan de manera más eficiente que el resto de las células tumorales el daño causado en el ADN, siendo menos sensible a la quimioterapia o a la radioterapia, causando recurrencia tumoral e incluso metástasis. El objetivo del trabajo fue establecer la diferencia en la expresión de los componentes de la etapa de sensado y la respuesta a daño al ADN, entre cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas y cultivos no enriquecidos, después de la exposición a radiación ionizante (IR). Primero se comparó la respuesta a IR entre cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas crecidas como esferas y los cultivos no enriquecidos crecidos como monocapa, ambas condiciones de crecimiento para las líneas tumorales HeLa y MCF-7. Para verificar que los cultivos de esfera estaban enriquecidos en CSC, se realizó la tinción para la proteína CD49f y la medición de la actividad de la enzima ALDH, de manera individual y simultáneamente, en células HeLa mediante citometría de flujo. Luego se evaluó si podían existir diferencias en la expresión de los elementos sensores en la vía de respuesta a daño en el ADN en estas condiciones de crecimiento. Se encontró que los cultivos de CSC mostraron menos sensibilidad a IR que los cultivos convencionales en monocapa. Se observó una mayor expresión basal de la versión activa de las proteínas ATM, H2A.X y PARP1, en cultivos de CSC previo a la exposición a IR. Estos hallazgos proporcionan una evidencia de que las proteínas sensoras de la vía de respuesta a daño al ADN están presentes y se activan de manera preferencial en CSC, en oposición al grueso de las células en cultivos de monocapa. Asimismo, proporcionan una idea de las diferencias en la respuesta a IR entre CSC y otras poblaciones de células tumorales. La comprensión de la vía de respuesta a daño al ADN puede proporcionar información acerca de la resistencia celular a la radioterapia, así como identificar algún blanco que sensibilice a las CSC a las terapias citotóxicas y en un futuro poder mejorar los tratamientos contra el cáncer.

2. ABSTRACT

Recently, a subpopulation of tumor cells, called cancer stem cells (CSC), has been characterized, and emerged as a major topic in cancer research. CSC are proposed to repair DNA damage more efficiently than the rest of tumor cells, resisting chemotherapy or radiotherapy and causing clinical recurrence and metastasis. The aim was to establish the difference in expression of components of the sensing stage and the response to DNA damage, between cancer stem cell-enriched cultures and non-enriched cultures, after exposure to ionizing radiation (IR). First, it was compared the response to IR between cancer stem cell-enriched cultures grown as spheres, and conventional tumor-cell line cultures grown as monolayer, from HeLa and MCF-7 cancer cell lines. To verify the enrichment in CSC, the staining of the CD49f protein and the measurement of the ALDH activity were carried out individually and simultaneously for HeLa cells by flow cytometry. Then, it was evaluated whether differences could exist in sensor elements in the DNA damage response pathway in these cultures. It was found that CSC cultures showed less sensitivity to radiation than conventional tumor-cell line cultures. It was observed a higher baseline expression of activated response sensor proteins of DNA damage, such as ATM, H2A.X, and PARP1, in untreated CSC cultures. These findings provide the first evidence, to our knowledge, that DNA damage response sensor proteins are present and preferentially activated in CSC, as opposed to the bulk of cells in monolayer cultures. Likewise, they provide an idea about of differences in response to IR between CSC and other tumor-cell populations. The understanding of DNA damage response pathway can provide information about cellular resistance to radiotherapy, as well as identify some target that sensitizes CSC to cytotoxic therapies and, in the future be able to improve cancer treatments.

3. ANTECEDENTES

3.1. CÁNCER Y CÉLULAS TRONCALES

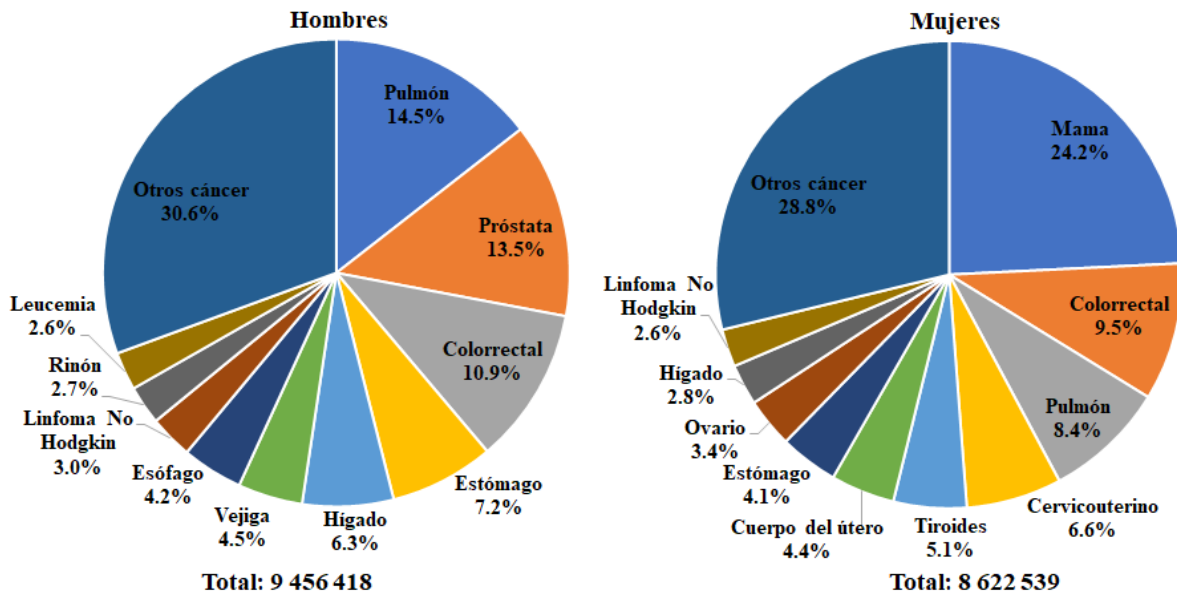
El cáncer es una enfermedad multifactorial, cuyos orígenes son genéticos y epigenéticos, resultando en un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células. La característica fundamental del cáncer, tanto biológica como clínica, es la alteración del crecimiento celular en órganos y tejidos, que en la mayoría de las veces se distingue por la proliferación de células malignas, invasión de tejidos cercanos, diseminación a sitios anatómicos distantes y finalmente la muerte del paciente como consecuencia de perturbaciones en la función normal de sus órganos y tejidos (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Para el año 2018, a nivel mundial se estimaron 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de muertes debido a éste. En hombres, el cáncer de pulmón fue el tipo de cáncer con mayor incidencia, mientras que en mujeres fue el cáncer de mama; por otra parte, estos mismos tipos de cáncer son los que causan la muerte en hombres y mujeres respectivamente con mayor frecuencia (Figura 1) (Bray Et al., 2018; Ferlay Et al., 2018). En el caso de México, para el 2018 se estimaron 190 mil nuevos casos de cáncer y 83 mil muertes por esta causa entre hombres y mujeres; siendo el cáncer de próstata y colorrectal los de mayor incidencia en hombres, mientras que en mujeres fue el cáncer de mama y de tiroides; por otro lado, el cáncer de próstata y de pulmón son lo de mayor mortandad en hombres, mientras que en mujeres lo fueron el cáncer de mama y cervicouterino (Figura 2) (International Agency for Research on Cancer, 2018). Siendo el cáncer de mama y cervicouterino aún problemas de salud pública en México por cáncer en mujeres.

En diversos tumores sólidos, incluyendo el cervicouterino (Feng et al., 2009; Hou et al., 2015) y el de mama (Grimshaw et al., 2008; Ponti et al., 2005), se ha evidenciado la presencia de una subpoblación celular conformada por las denominadas células troncales cancerosas (CSC, del inglés *cancer stem cells*) (Ailles y Weissman, 2007; O'Brien, Kreso, y Dick, 2009; Tirino et al., 2013). Las CSC se caracterizan por estar en un grado de indiferenciación celular, poseer la capacidad de autorrenovación y además por tener el potencial de dar origen y mantener a las células que conforman al tumor. Este

hallazgo ha creado nuevos enfoques en la investigación sobre el cáncer; entre ellos, la sensibilidad de los tumores a los tratamientos como la quimioterapia y radioterapia (Dalerba, Cho, y Clarke, 2007; Ishii et al., 2008).

Incidencia de cáncer a nivel mundial



Mortalidad por cáncer a nivel mundial

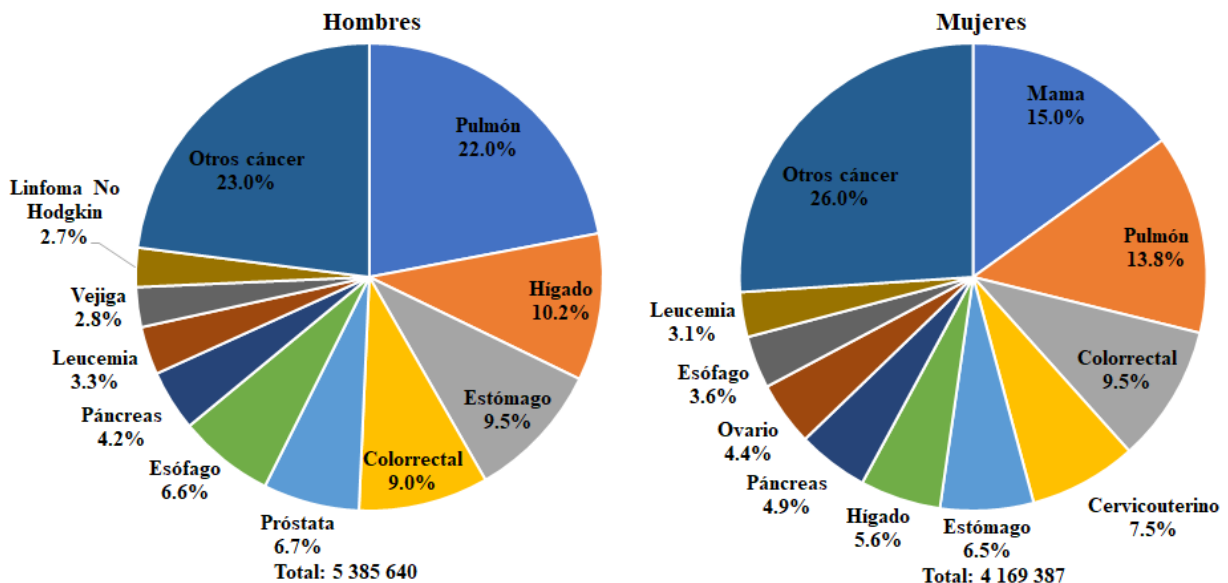


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer por sitio anatómico a nivel mundial. Entre los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial aventaja el cáncer de pulmón y de mama en hombres y mujeres, respectivamente (International Agency for Research on Cancer, 2018).

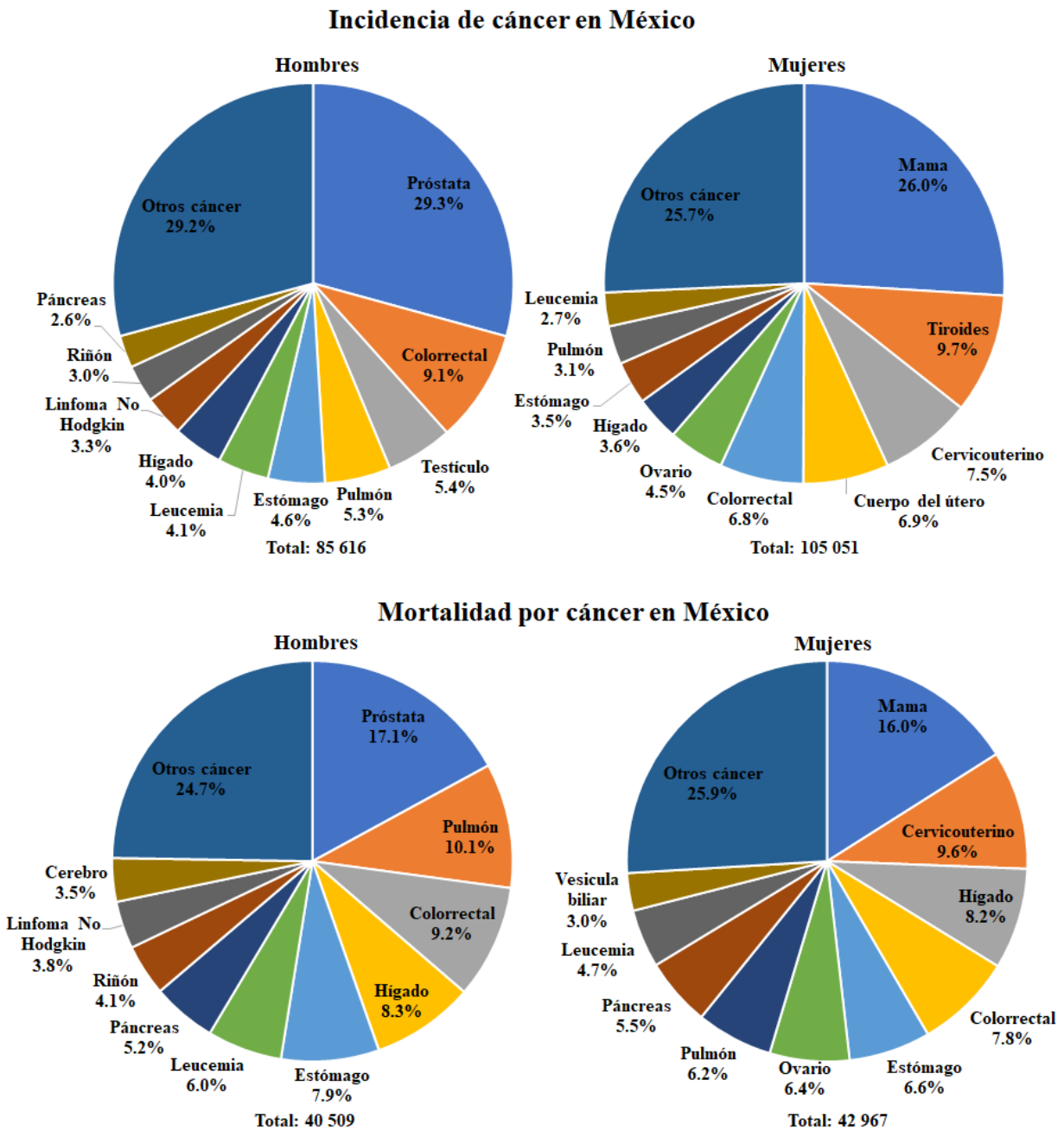


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer por sitio anatómico en México. Entre los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en México aventajan el cáncer de próstata y de mama para hombres y mujeres, respectivamente (International Agency for Research on Cancer, 2018).

3.1.1. Células troncales normales

La definición de células troncales debe hacerse de acuerdo a criterios funcionales debido a que estas células no poseen características morfológicas que puedan distinguirlas de las demás. Las células troncales se han definido como células inmaduras o indiferenciadas, con la capacidad de autorrenovarse y que pueden diferenciar, de acuerdo a un proceso jerárquico, hacia uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (Mayani, 2013) (Figura 3)

Una célula indiferenciada es aquella célula que no ha alcanzado la especialización totalmente. El proceso de diferenciación celular consiste en la adquisición de funciones y características específicas; si bien la definición hace referencia a las células embrionarias, las cuales se diferencian hacia tejidos especializados como el corazón, hígado, cerebro, entre otros; el proceso también se presenta en células indiferenciadas presentes en los organismos adultos (Lobo, Shimono, Qian, y Clarke, 2007; National Institutes of Health, 2016). Durante el proceso de diferenciación, después de la autorrenovación, se generan una o dos células progenitoras hijas; estas células progenitoras son las células que proliferarán y darán origen a la población celular que compone al tejido al que pertenecen. Una característica de las células progenitoras es que carecen de la habilidad de autorrenovación, pero si diferencian hacia los linajes celulares a los cuales están dirigidas y son ampliamente más frecuentes que las células troncales en el tejido u órgano (Muschler, Midura, y Nakamoto, 2003; Rodriguez-Fontan et al., 2016).

La autorrenovación es el proceso mediante el cual las células troncales se dividen y se requiere que al menos una de las células nuevas tenga el mismo potencial de autorrenovación. La capacidad de autorrenovación en las células troncales es esencial para mantener y expandir el número de células troncales ya sea durante el desarrollo embrionario o en el tejido adulto. La autorrenovación no es lo mismo que proliferación, aunque ambos procesos involucren la división celular. La proliferación es un término más general que incluye todos los tipos de división celular, incluyendo la autorrenovación (He, Nakada, y Morrison, 2009). Cuando se activa una célula troncal para dividirse, en cualquier etapa de desarrollo, hay tres posibles mecanismos.

Uno es el mecanismo clásico para la autorrenovación, que es la división asimétrica la cual produce una célula hija que es idéntica a la célula original y otra célula hija progenitora la cual proliferará y diferenciará; este mecanismo por sí mismo sería suficiente para mantener la población de células troncales en adultos. El segundo mecanismo consiste en obtener dos células troncales, que son idénticas a la original, a través de una la división simétrica. Alternativamente, en un tercer mecanismo por división simétrica, las dos células hijas obtenidas pueden resultar diferentes a la célula original y ninguna poseer la habilidad de autorrenovación. Cada uno de estos caminos puede ser posible cuando las células troncales se dividen. Cuando el objetivo de la división celular es el mantenimiento de las poblaciones de células troncales, la división simétrica se vería favorecida; en caso contrario se favorecería la división asimétrica si la situación no es el mantenimiento de las células troncales. Se puede mantener una población de células troncales incluso si la probabilidad de división asimétrica es baja (Muschler et al., 2003).

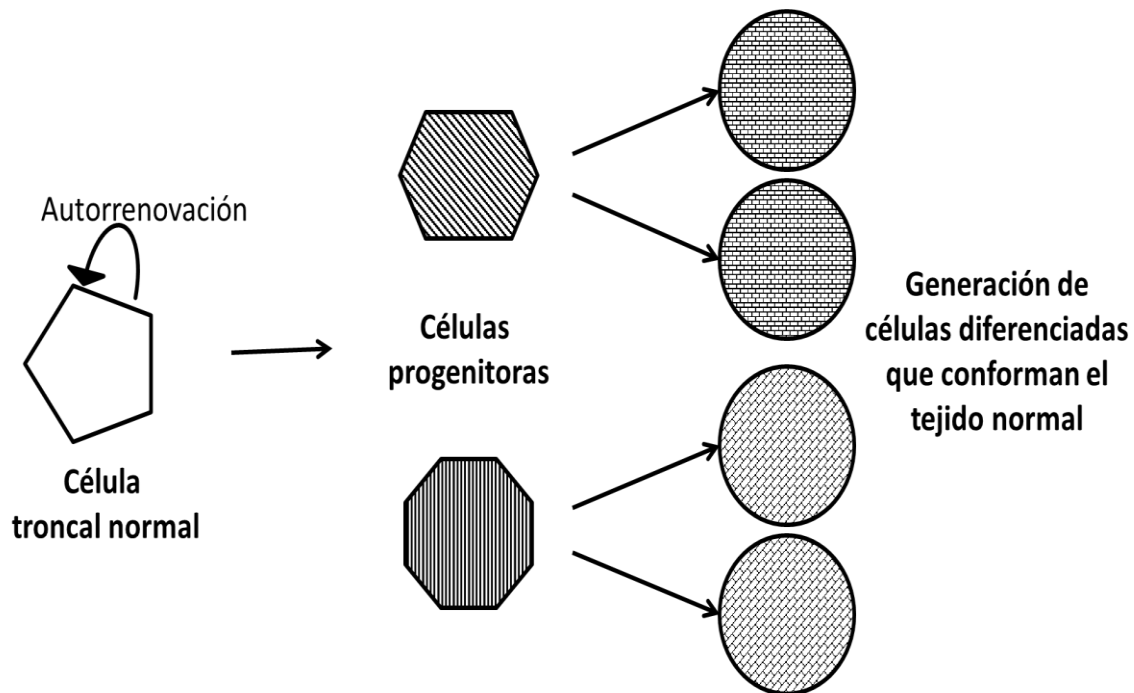


Figura 3. Diferenciación celular en base al modelo jerárquico. Durante el proceso de diferenciación celular, las células troncales tienen mayor jerarquía al ser quienes dan origen al resto de las poblaciones celulares que conforman a los órganos y tejidos.

La clasificación más común de las células troncales se basa en la potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes, lo cual está relacionado con el grado de diferenciación y la capacidad de dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente diversifican y especializan de acuerdo al modelo jerárquico, manteniendo a la población celular del tejido y reemplazando células dañadas o elementos ya maduros (Lobo et al., 2007).

Las células troncales totipotenciales tienen la capacidad de dar origen a todas las células de un embrión completo; originan las tres capas germinales ectodermo, endodermo y mesodermo, así como el saco vitelino, alantoides, amnios y corion que constituyen los tejidos extraembrionarios. Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito, formando la célula diploide que se conoce como cigoto, la cual se caracteriza por ser totipotencial. Las células troncales pluripotenciales, que se derivan del embrioblasto, también llamado masa celular interna del blastocisto, son capaces de formar todas las células de los tejidos embrionarios; es decir, cualquier tipo de célula que se encuentre en un individuo, aunque no son capaces de originar un individuo entero porque no pueden diferenciarse en células extraembrionarias. Las células troncales multipotenciales poseen la capacidad de diferenciarse a un limitado linaje de células relacionadas estrechamente entre sí, las cuales formarán algún tejido específico.

Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario, después del estado de blastocisto, la mayoría de las células se diferencia, comienza sus funciones especializadas y pocas mantienen las propiedades de troncalidad. En los organismos ya adultos, la mayoría, si no es que todos los órganos y tejidos, contienen una pequeña reserva de células troncales denominadas células troncales adultas. Por lo general permanecen con poca división celular; sin embargo, tienen la capacidad de dividirse si fuera necesario para el mantenimiento normal y la reparación de daños en estos órganos y tejidos. Las células troncales adultas son multipotentes por lo que su capacidad de diferenciarse se limita al tipo de células presentes en el órgano o tejido que las contiene (Mummery, van de Stolpe, Roelen, y Clevers, 2014).

3.1.2. Células troncales cancerosas

A pesar de la mejora de los tratamientos en las diferentes etapas de la enfermedad, en estadios avanzados, la recurrencia tumoral se presenta hasta en el 70 % de los pacientes que han sido tratados. Como en el cáncer cervicouterino, donde el 90 % de estos casos ocurren dentro de los 3 años después del tratamiento inicial (Pectasides, Kamposioras, Papaxoinis, y Pectasides, 2008), por tanto es imprescindible el mejoramiento de la terapia en este padecimiento.

La resistencia celular al tratamiento antineoplásico es hoy en día uno de los principales problemas en control efectivo de algunos tipos de tumores. Si bien mucho se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, se piensa que el fenómeno de resistencia al tratamiento puede deberse a la combinación de varios mecanismos, más que a la acción individual de cada uno de ellos. Esta falta de respuesta al tratamiento está relacionada con diversos factores a considerar como los eventos farmacocinéticos, la biología y el tipo de tumor, la respuesta intrínseca del paciente, la ubicación del tumor en sitios inaccesibles y la resistencia celular a los fármacos; siendo este último el obstáculo más importante para un tratamiento exitoso contra el cáncer (Lizano Soberón y Barrera Rodríguez, 1993).

De la misma manera que las células troncales normales generan y mantienen el tejido sano, las células troncales cancerosas (CSC) son la fuente de la población celular que mantiene en crecimiento al tumor a largo plazo (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, y Clarke, 2003; Dalerba et al., 2007; Darini, Pisani, Hofman, y Pedeutour, 2011; Pardal, Clarke, Morrison, Medical, y Arbor, 2003; Seufferlein et al., 2009; Vaish, 2007). Sin embargo, al no ser enfocado el tratamiento para el cáncer hacia estas CSC, no son afectadas como el resto de las células cancerosas y su permanencia en el sitio donde se ubicaba el tumor da lugar a progenie que formará nuevamente al tumor, dando lugar así a la recurrencia tumoral, al desarrollo de poblaciones resistentes al tratamiento con fármacos o radiación, incluso causando causar metástasis después de la terapia (Dawood, Austin, y Cristofanilli, 2014; Ishii et al., 2008; Yoshida y Saya, 2016).

Las CSC forman parte de una subpoblación dentro del tumor, también tienen la capacidad de autorrenovación y poseen un estado indiferenciado lo que sugiere que sean

las responsables de la heterogeneidad celular (Figura 4). En conjunto, los datos descritos para la heterogeneidad tumoral establecen que los tumores no solo son morfológicamente heterogéneos, sino que son funcionalmente heterogéneos en términos de proliferación celular o incluso de iniciación de tumores basados en ensayos de trasplante, como experimentalmente también son definidas las CSC al generar tumor durante trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes. De acuerdo con el modelo jerárquico, esta heterogeneidad celular es originada por una subpoblación de células indiferenciadas y autorrenovables que son posible identificar y aislar del resto de las células que conforman al tumor mediante algunas de sus características intrínsecas como la expresión y función de proteínas específicas (Dick, 2008; Seufferlein et al., 2009).

En líneas celulares y tumores derivados de cáncer cervicouterino, se han identificado subpoblaciones con características de células troncales cancerosas, las cuales muestran un mayor potencial tumorigénico (Bortolomai, Canevari, y Facetti, 2010; Feng et al., 2009; López, Poitevin, Mendoza-Martínez, Pérez-Plasencia, y García-Carrancá, 2012).

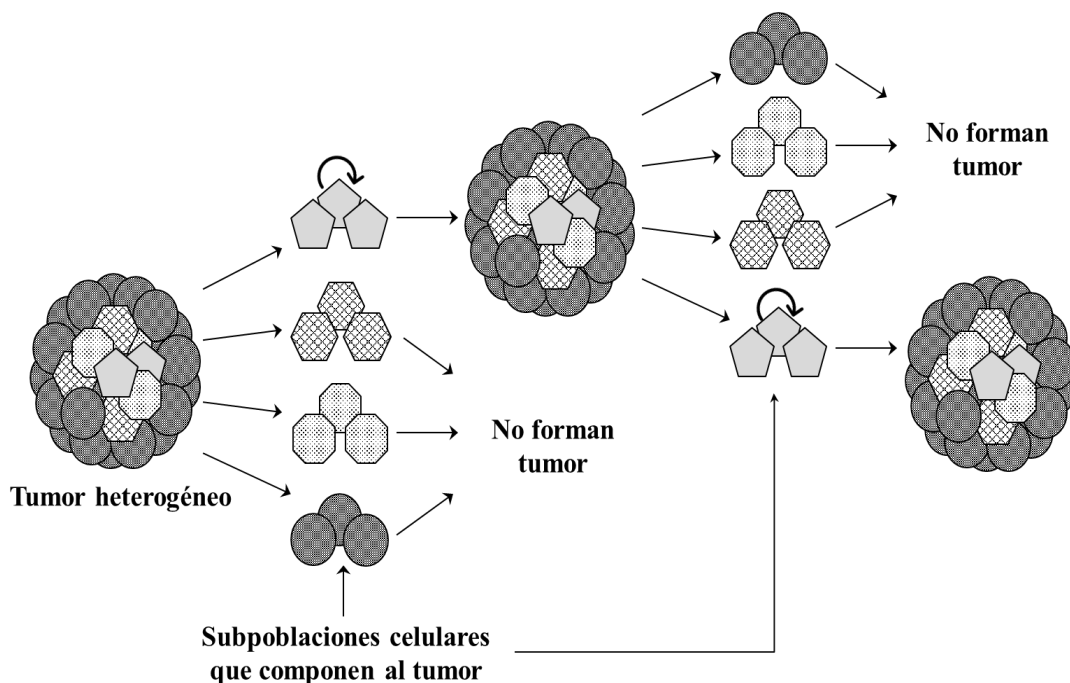


Figura 4. Las células troncales cancerosas en el tumor. Las células troncales cancerosas, al igual que las troncales normales, dan origen a una población celular heterogénea, que en este caso compone al tumor. Además, son las únicas con la capacidad de generar de nuevo un tumor igualmente heterogéneo, siguiendo así el modelo jerárquico (Modificado de (Dick, 2008)).

3.2. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Para la obtención, identificación y el estudio de cultivos de CSC existen varias estrategias metodológicas como el ensayo de formación de esferas y la identificación de marcadores celulares por inmunodetección de proteínas, así como la evaluación de la función de algunas enzimas presentes en las CSC.

3.2.1. Ensayo de formación de esferas

In vivo, las células de los tumores sólidos crecen en una conformación espacial tridimensional, lo que resulta en una exposición heterogénea al oxígeno, a nutrientes, así como a otros estímulos tanto físicos como químicos. Aunque los cultivos celulares bidimensionales en monocapa han sido útiles para obtener información acerca de diversos procesos biológicos, no simulan las limitaciones que tienen algunas de las células, por su ubicación en la conformación tridimensional, a la difusión de oxígeno, nutrientes, metabolitos, además de fármacos y factores de crecimiento que son adicionados al medio de cultivo. Ahora se sabe que la interacción tridimensional célula-célula influye *per se* en la estructura celular, la adhesión, la mecanotransducción y la señalización en respuesta a factores solubles, que, a su vez, regulan la función celular general de manera tal que difieren dramáticamente de los formatos tradicionales de los cultivos bidimensionales. Por lo tanto, el estudio de las células en un contexto tridimensional, como el ensayo de formación de esferas, puede proporcionar información no observada en las monocapas tradicionales (Weiswald, Bellet, y Dangles-Marie, 2015).

Para referirse a los cultivos tridimensionales se ha usado el término “organoides” y “esferas o esferoides”. El término organoide alude a un órgano, pero en miniatura; y debe emplearse para el cultivo tridimensional obtenido a partir de células que se organizan de manera análoga al órgano o tejido del que provienen. Con el término de esfera se hace referencia al cultivo tridimensional que forma estructuras en forma de esferoides, este cultivo proveniente de células únicas o individuales que han sido disociadas mecánicamente o enzimáticamente y crecen en suspensión a baja densidad celular (Figura 5) (Mehta, Novak, Raghavan, Ward, y Mehta, 2018; H. Wang, Paczulla, Konantz, y Lengerke, 2018; Weiswald et al., 2015). El cultivo de esferas ha permitido la selección,

mantenimiento y expansión de células troncales tanto normales como cancerosas (Lázaro et al., 2003; Richardson et al., 2004; Sato et al., 2009).

Es importante identificar adecuadamente las estructuras que son formadas al realizar cultivos tridimensionales; por ejemplo, la siembra de células a alta densidad en suspensión genera "agregados celulares". El término de agregado celular describe a la estructura tridimensional obtenida por la agrupación de las células inicialmente sembradas; estas agrupaciones o agregados son similares estructuralmente a las esferas, lo que dificulta distinguir entre ellas. (Mayer et al., 2001). Algunas de las denominadas "esferas" en la literatura resultan ser agregados y no esferas originadas desde una sola célula. Estos agregados con frecuencia podría no solo no tienen una verdadera geometría esférica, sino posiblemente tampoco las interacciones célula-célula o célula-matriz que tendrían las células individuales a baja densidad, impactando en las propiedades biológicas como las de troncalidad (Weiswald et al., 2015).

Con el tiempo, diversas modificaciones experimentales han sido añadidas a la metodología de cultivos tridimensionales, entre las que destacan la composición del medio, la densidad celular, el tipo y tamaño de superficie de las placas de cultivo, así como el tiempo de crecimiento. Esta diversidad de modificaciones ha favorecido que diferentes grupos de investigación generen varios tipos de cultivos y consecuentemente resultados también diferentes (Gaebler et al., 2017; Pastrana, Silva-Vargas, y Doetsch, 2011; Toda et al., 2011; Weiswald et al., 2015), por lo que hay que ser cuidadoso al generar cultivos de esferas y con la interpretación de los datos tanto obtenidos como los previamente ya reportados.

Se ha utilizado el ensayo de formación de esfera como un ensayo funcional para el enriquecimiento, a partir de líneas celulares de cáncer, en células indiferenciadas con capacidad tumorigénica acentuada (Grimshaw et al., 2008; Ponti et al., 2005), para aislar y caracterizar CSC de varios tipos cáncer como el de cerebro (Lathia et al., 2010; Louis et al., 2008), de pulmón (Corominas-Faja et al., 2013; Lundholm et al., 2013), de mama (Cariati et al., 2008; Dontu et al., 2003; Goel et al., 2014; Ponti et al., 2005; Schott et al., 2013) o de ovario (Pan y Huang, 2008), entre otros. Células troncales de diversos tejidos se mantienen típicamente *in vitro* bajo condiciones no adherentes como esferas en

suspensión resultando de gran importancia para el estudio de la biología de células troncales, ya que teóricamente tanto la autorrenovación como la diferenciación pueden evaluarse a nivel de células individuales una vez obtenidas (Pastrana et al., 2011). Las primeras evaluaciones en cultivos tridimensionales de esferas en suspensión fueron realizadas en los años 70 por radiólogos, quienes determinaron la radiosensibilidad de una amplia diversidad de líneas celulares de cáncer, introduciendo así el modelo multicelular de esferoides tumorales (Sutherland, Inch, McCredie, y Kruuv, 1970).

El término para identificar a estos cultivos de esferas derivadas de células cancerosas es “oncoesferas” o “tumoresferas”; sin embargo, es común nombrarlos de acuerdo al tejido u órgano al que pertenecen para relacionarlos. Cultivos de esferas obtenidas del sistema nervioso se denominan neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992; Singh et al., 2003); del tejido mamario, mamoesferas (Dontu et al., 2003; Ponti et al., 2005); del cérvix uterino, cervoesferas (Ortiz-Sánchez et al., 2016) las por mencionar algunos ejemplos.

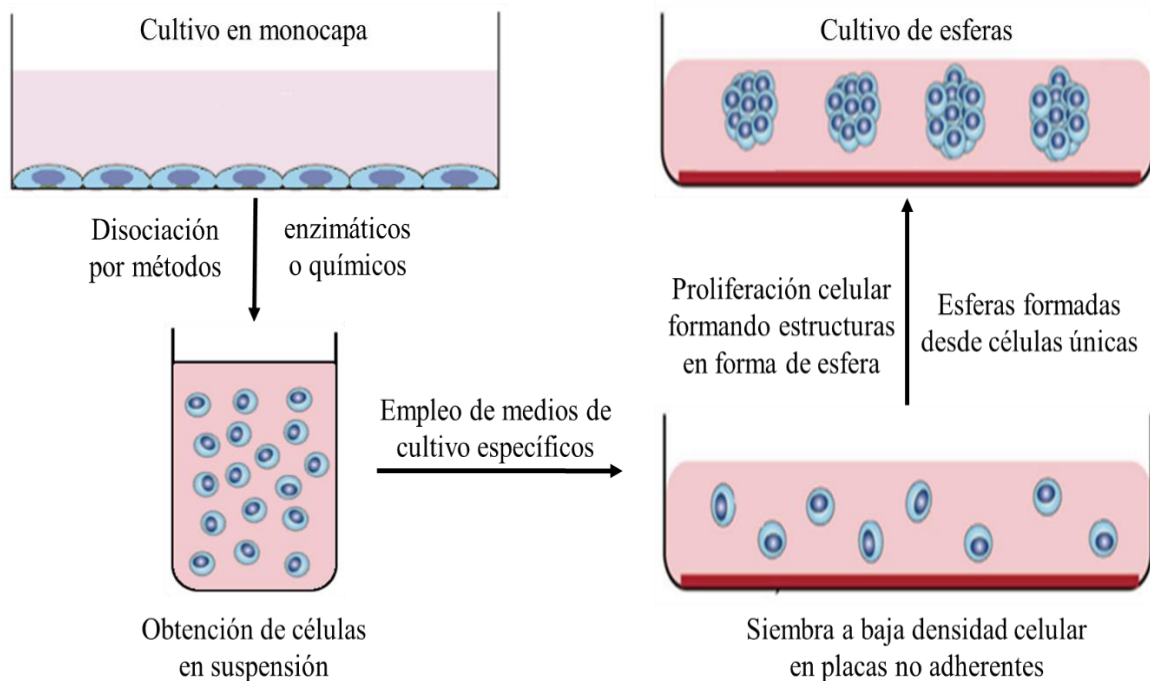


Figura 5. Ensayo de formación de esferas. La obtención de cultivos de esferas consiste en generar estructuras en forma de esfera a partir de células únicas o individuales que están en suspensión en placas de cultivo no adherentes y empleando medios de cultivo específicos. Esta metodología permite la obtención de subpoblaciones celulares específicas como lo es la de células troncales cancerosas enriqueciendo al cultivo en este tipo de células.

3.2.2. Marcadores de células troncales cancerosas

La identificación de marcadores de superficie en subpoblaciones de células troncales cancerosas han permitido reconocerlas y aislarlas (Wang, Ongkeko, Chen, y Yang, 2010). Con el conocimiento de estos marcadores es posible describir y comprender mejor los procesos moleculares por los cuales las células mantienen sus propiedades de troncalidad y se amplía el campo de investigación para comprender su comportamiento en respuesta a daños causados por agentes tanto físicos como químicos.

a) Integrina CD49f

La proteína CD49f es una integrina $\alpha 6$ transmembranal que se ha identificado en células germinales desde estadios embrionarios hasta células somáticas en organismos adultos (Krebsbach y Villa-Diaz, 2017). Las integrinas son una familia de glicoproteínas transmembrana de tipo I compuestas de subfamilias α y β . En los mamíferos, la subfamilia α tiene 18 subunidades, mientras que la subfamilia β comprende de 8 subunidades. Juntas, estas subunidades forman al menos 24 combinaciones diferentes de heterodímeros que tienen afinidades únicas para los componentes de la matriz extracelular (MEC), incluidas las lamininas, colágenos y fibronectina, teniendo funciones específicas y no redundantes (Hynes, 2002). Las integrinas desempeñan un papel clave en la adhesión celular a los ligandos de la MEC y con las células adyacentes, además sirven como enlace entre los contactos extracelulares y el citoesqueleto intracelular.

Al formar heterodímeros con integrina $\beta 1$ (CD29) o integrina $\beta 4$ (CD104), la integrina $\alpha 6$ funciona como un receptor para las siguientes lamininas: LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMC1 y LAMC2; y activa vías de señalización clave para la invasión y migración de células en carcinomas (Belkin y Stepp, 2000; Yoon, Shin, y Lipscomb, 2006). Además, la integrina $\alpha 6$ tiene dos isoformas con distintas variantes citoplásmicas, $\alpha 6A$ y $\alpha 6B$, que se generan a través empalme de ARN mensajero alternativo. Por lo tanto, la señalización dirigida por la integrina $\alpha 6$ varía según la isoforma dominante expresada, la cadena β con la que se asocia para formar un heterodímero y el ligando con el que se une (Krebsbach y Villa-Diaz, 2017).

En células troncales CD49f es un marcador común en diversos tejidos desempeñando importantes funciones como el anclaje al nicho, la regulación de la división, diferenciación y migración. La expresión espacial y temporal de distintas variantes citoplasmáticas en células troncales tanto embrionarias como adultas sugiere que tienen funciones distintas durante la embriogénesis y en la edad adulta, mientras que la desregulación de estas señales puede ser la base de una amplia gama de enfermedades humanas (Z. Zhou et al., 2018). Se ha reportado que la troncalidad y la propiedad multipotencial de células troncales mesenquimales y de troncales embrionarias humanas son mantenidas por la presencia de CD49f (K. R. Yu et al., 2012). Además, la alta expresión de CD49f se ha asociado con la tumorigenicidad en cáncer gástrico (Fukamachi et al., 2013), por ejemplo; y con un mal pronóstico en pacientes con cáncer cervicouterino (Hou et al., 2015).

b) Enzima ALDH

La superfamilia de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) está integrada por isoenzimas (enzimas que difieren en secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción) involucradas en la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos. Los aldehídos pueden ser exógenos o generados de manera endógena por una amplia variedad de procesos metabólicos, surgiendo generalmente de la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana. Aunque la mayoría de los aldehídos son citotóxicos, muchos desempeñan un papel fundamental en procesos fisiológicos como la visión, la neurotransmisión y el desarrollo embrionario (Marchitti, Brocker, Stagos, y Vasiliou, 2008). Algunas de las isoenzimas de ALDH como son la ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 y ALDH8A1 funcionan en la vía de señalización del ácido retinoico, el cual lo producen por oxidación del compuesto retinal. Esta función en particular, se ha relacionado con la troncalidad (Marcato, Dean, Giacomantonio, y Lee, 2011), teniendo un papel en la diferenciación temprana de las células troncales (Vassalli, 2019).

Ya desde el 2007 la enzima ALDH era reconocida como un marcador de CSC asociándola con la quimiorresistencia en cáncer de mama (Ginestier et al., 2007; Tanei et al., 2009), y se ha reportado que acentúa el potencial de autorrenovación y

diferenciación en células troncales de cáncer cervicouterino (Xie et al., 2016). Su papel en el mantenimiento de la troncalidad, en la resistencia a fármacos y su utilidad para el enriquecimiento en subpoblaciones de CSC de varias líneas celulares y tumores sólidos la han hecho confiable. Aunque la sobreexpresión de la enzima ALDH se considera un factor para la predicción del pronóstico de varios cánceres humanos, la medición de su actividad por el ensayo ALDEFLUOR® ha hecho posible un número creciente de publicaciones sobre sus diversas isoformas (Toledo-Guzmán, Ibañez-Hernández, Gómez-Gallegos, y Ortiz-Sánchez, 2019).

ALDEFLUOR® es un conjunto de reactivos que se utiliza para identificar la actividad de ALDH en células humanas. El reactivo ALDEFLUOR™ activado llamado aminoacetaldehído de BODIPY (BAAA, BODIPY es la abreviatura para borodipirrometano), es un sustrato para la ALDH, es fluorescente, se difunde libremente en células intactas y viables además de no ser tóxico para ellas. En presencia de ALDH, BAAA se convierte en aminoacetato de BODIPY (BAA), el cual es retenido dentro de las células por inhibición de los transportadores moleculares tipo ABC (*ATP-Binding Cassettes*) mediante el reactivo ALDEFLUOR™ *Assay Buffer*. La cantidad del producto de reacción BAA fluorescente es proporcional a la actividad de la ALDH en las células y se mide utilizando un citómetro de flujo. Para medir y controlar la fluorescencia de fondo, se emplea el inhibidor específico de ALDH, el dietilaminobenzaldehído (DEAB). Las células fluorescentes y viables pueden ser aisladas de las que no lo son por *sorting* (Ma y Allan, 2011; STEMCELL Technologies Inc., 2018).

3.3. DAÑO AL ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la biomolécula que contiene la información genética de la célula y se encuentra localizada en el núcleo de la misma. El daño al ADN se refiere a los cambios físicos o químicos que ocurren en el material genético de las células, este cambio puede afectar tanto la transcripción como la replicación del material genético. El ADN puede ser dañado por factores endógenos y exógenos, dentro de estos últimos se encuentran sustancias químicas, radicales libres y la radiación, causando cada uno distintas formas de lesiones. Por ello, la célula ha integrado complejos procesos para conservar la integridad de su genoma. Dependiendo de la naturaleza de la lesión, vías

de señalización son activadas para identificar el tipo de daño, la ubicación del daño y la reparación del mismo (Srinivas, Tan, Vellayappan, y Jeyasekharan, 2019). El daño con mayor repercusión en la viabilidad celular es la ruptura de cadena doble (DSB por las siglas en inglés de *double strand break*).

La resistencia al tratamiento con fármacos y radiación también ha caracterizado a las células troncales cancerosas. Los mecanismos subyacentes a esta eficacia incluyen una alta expresión de transportadores ABC que expulsan los fármacos de la célula, la alteración de las cinéticas del ciclo celular, influencia de factores microambientales y la presencia de una maquinaria de reparación del ADN competente (Maugeri-Saccà, Vigneri, y De Maria, 2011).

Cuando ocurren alteraciones en el ADN, una serie de eventos se activan y que en conjunto se denomina vía de respuesta a daño al ADN. Los mecanismos de resistencia de las CSC a la terapia incluyen, entre otros aspectos, una sobreexpresión de proteínas de reparación del ADN (Dalerba et al., 2007; Ishii et al., 2008; Maugeri-Saccà et al., 2011). Las lesiones más dañinas y más estudiadas en el ADN son DSB, estas lesiones pueden ser originadas por la radiación ionizante durante la radioterapia, la cual es utilizada como tratamiento en el cáncer en estadios avanzados.

3.3.1. Radiación ionizante

A la desintegración espontánea de los átomos se denomina radiactividad, y la energía excedente emitida es la radiación ionizante (IR). La IR es un tipo de energía liberada por los átomos en forma de partículas (partículas alfa, partículas beta o neutrones) u ondas electromagnéticas (rayos gamma o rayos X) de muy alta frecuencia con la suficiente energía como para producir la ionización de un átomo y romper los enlaces atómicos que mantienen unidas a las moléculas como las que se encuentran en las células. Estas alteraciones pueden ser más o menos graves según la dosis y el tipo de radiación recibida (Consejo de Seguridad Nuclear, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2016).

Las partículas alfa, que son núcleos de helio 4 que se emiten en determinadas desintegraciones nucleares y que están formados por dos neutrones y dos protones.

Tienen mucha masa, pero son poco penetrantes: una hoja de papel o la misma piel humana son suficientes para protegerse de sus efectos. Las partículas beta, que son flujos de electrones (beta negativas) o positrones (beta positivas) liberados en determinadas desintegraciones nucleares. Tienen menos masa que las partículas alfa, aunque son algo más penetrantes: pueden traspasar una hoja de papel y entre uno y dos centímetros de tejido vivo, pero no pueden penetrar una lámina de aluminio.

Los rayos gamma y X son radiaciones electromagnéticas sin carga ni masa. Las radiaciones gamma proceden de la desintegración de los núcleos inestables de algunos elementos radiactivos y los rayos X proceden de las capas externas del átomo, donde se encuentran los electrones. Este tipo de radiaciones son bastante penetrantes, atraviesan la hoja de papel y la lámina de aluminio y para frenarlas se precisa una lámina de plomo de grosor suficiente. Los neutrones liberados son un tipo de radiación muy penetrante. Al no tener carga eléctrica, los neutrones penetran fácilmente la estructura de determinados átomos y provocan su división. Se pueden absorber con determinados elementos químicos como el cadmio o el boro.

La dosis de radiación es la cantidad de energía de radiación absorbida por unidad de masa de tejido irradiado y la unidad de medición actual de la dosis es el gray (Gy), el cual equivale a 1 Joule por kilogramo. Ordinariamente, las dosis se prescriben o informan en centigrays (cGy) y éste último es matemáticamente idéntico al rad, que es la unidad más antigua de medición de la radiación (Feldmeier, 1997). La radiación ionizante empleada en la radioterapia para tratar el cáncer puede causar daño al ADN directamente por la interacción de la energía con las cadenas de ADN en el núcleo celular o indirectamente por la generación de radicales libres en el interior de la célula. La interacción indirecta es la causante de cerca del 80% de los daños en el ADN, los cuales ocurren cuando los radicales libres, producidos por la ruptura de moléculas de agua, difunden hacia el núcleo y reaccionan con el ADN (Alegre N., 2001; Srinivas et al., 2019)

Se estima que en células humanas diploides, por cada dosis de 1 Gy de radiación gamma absorbida, se producen 105 ionizaciones por célula, causando cerca de 2000 rupturas de cadena sencilla y hasta 40 rupturas de cadena doble en el ADN, además de otros desperfectos incluyendo hasta 10000 bases nitrogenadas dañadas, así como

enlaces cruzados entre las moléculas mismas de ADN o entre proteínas con moléculas de ADN (Maalouf et al., 2019; Minniti, Goldsmith, y Brada, 2012; Prise, Schettino, Folkard, y Held, 2005). Los rayos gamma son una forma de radiación ionizante que se compone de paquetes de energía sin peso llamados fotones, pueden pasar completamente a través del cuerpo humano y conforme avanza, pueden dañar las biomoléculas de las células de los tejidos.

No toda la radiación incidente deposita su energía con la misma densidad lineal a lo largo del trayecto de los tejidos que atraviesa y el concepto para describir estas diferencias es la transferencia lineal de energía (LET, por sus siglas en inglés de *linear energy transfer*). La LET es la cantidad de energía absorbida o transferida por unidad de longitud de penetración en el material absorbente, siendo la unidad de medición comúnmente utilizada el kiloelectrón-voltio por micrómetro ($\text{keV}/\mu\text{m}$). Clásicamente, las radiaciones ionizantes electromagnéticas son considerados como radiación de baja LET, en general alrededor de $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$ o menor; el valor típico de LET para los rayos gamma es $0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ y el LET para los rayos X es $2.0 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Por otro lado, las partículas ionizantes tienen valores de LET más altos, las partículas alfa son de alrededor de $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (Feldmeier, 1997; Okayasu, 2012).

3.3.2. Vía de Respuesta a Daño al ADN

Los avances en el estudio de la vía de respuesta a daño al ADN (DDR, por las siglas en inglés de *DNA Damage Response*) han cambiado profundamente la visión conceptual del campo y han resaltado algunos de los mecanismos clave sobre el inicio de la señalización del daño al ADN. Ahora es claro que DDR es una vía de transducción de señales de una cascada de cinasas activada por daño al ADN y el estrés de la replicación, más que una vía que regula al ciclo celular. La vía DDR se desarrolla a través de una serie de etapas (Figura 6) que involucra el sensado del daño, la transducción y mediación de la señal de daño, así como la activación de la respuesta celular por parte de los efectores. Esta respuesta celular permite asegurar el mantenimiento de la estabilidad genómica, la regulación del avance del ciclo celular, la activación de la transcripción, el reclutamiento de la maquinaria de reparación del ADN y en algunos

casos la inducción de la muerte por apoptosis (Blanpain, Mohrin, Sotiropoulou, y Passegue, 2011; Harper y Elledge, 2007; Maugeri-Saccà, Bartucci, y De Maria, 2012; Smith, Smith, y Mézard, 2001; B.-B. S. Zhou y Elledge, 2000)

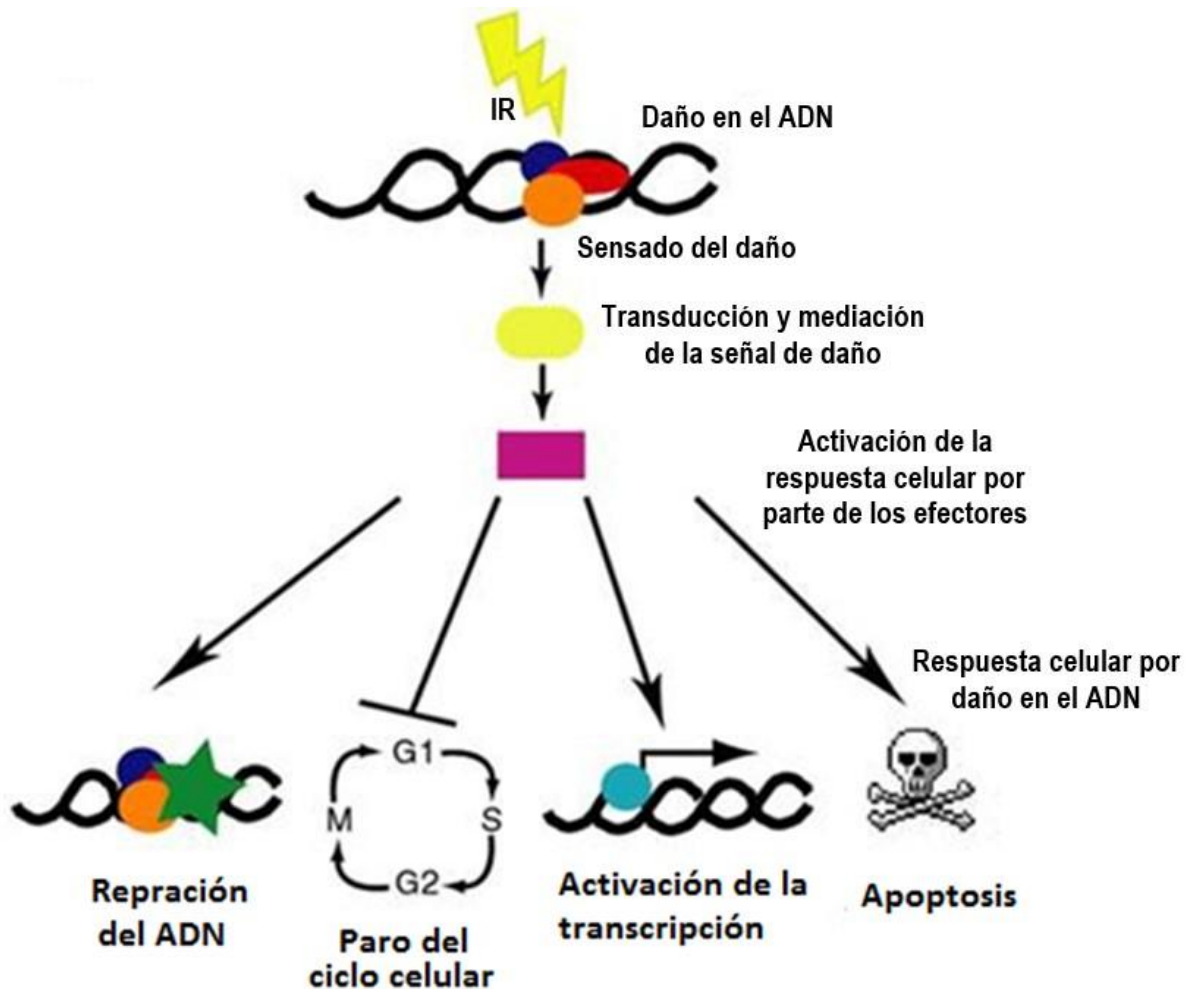


Figura 6. Vía de respuesta a daño al ADN (DDR). La vía DDR es un conjunto de vías de señalización que la célula emplea para la activación de una respuesta celular con la finalidad de mantener su sobrevivencia o inducir su muerte debido a daños en el ADN (modificado de (Smith et al., 2001)).

Durante la etapa de sensado del daño (Figura 7), para proteger adecuadamente el genoma, se detectan los tipos de alteraciones estructurales del ADN, principalmente las rupturas de cadena doble, así como las de cadena sencilla, entre otras alteraciones más como sitios ausentes de alguna base nitrogenada, bases mal apareadas o los enlaces covalentes entre bases, los cuales bloquean la replicación y transcripción del ADN. Entre los elementos que pueden detectar y señalar diferentes tipos de daño en el ADN, destaca la proteína cinasa Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) para identificar las DSB. Estas son primeramente detectadas mediante ATM que podría sensar la lesión del ADN debido a las alteraciones topológicas en la cromatina causadas por las mismas DSB.

En la transducción y mediación de la señal de daño, las proteínas involucradas actúan directamente río abajo de ATM como sustratos que desempeñan diversas funciones, actuando como reclutadores de sustratos adicionales y como andamios sobre los cuales se ensamblan diversos complejos. Entre los que se encuentran Mdc1, 53BP1, el complejo MRN, Claspin, Brit1/Mcph1 y Brca1 como mediadores; en el sitio donde está el daño, la histona H2A.X es fosforilada en la serina número 139 (Ser139) por ATM, ATR o DNA PKc. Esta fosforilación permite el reclutamiento de Mdc1, que actúa amplificando la fosforilación de H2A.X, posiblemente reteniendo a pATM o previniendo la desfosforilación de H2A.X, por otra parte, la proteína PARP1 se recluta al sitio donde está la DSB; ambas sirven como sensores e identificadores del daño para que se ensamble en el sitio la maquinaria de reparación.

En la etapa donde los efectores activan la respuesta celular por el daño en el ADN, la clave para comprender el significado fisiológico de las vías reguladas por las proteínas cinasas se encuentra en sus sustratos de fosforilación. Hasta ahora se han identificado más de 700 proteínas fosforiladas en respuesta a IR mostrándose un enriquecimiento muy fuerte para las proteínas involucradas en la replicación del ADN, lo que permite en gran explicar por qué la estabilidad de la horquilla y la lentitud de la replicación del ADN son constantes. También se ha observado un enriquecimiento en factores con roles conocidos en la reparación directa del ADN, el metabolismo de los nucleótidos, la reparación acoplada a la transcripción, la reparación por escisión global, la reparación de bases mal apareadas, la reparación de enlaces cruzados y la recombinación homóloga. Estas conexiones subrayan el papel crítico que desempeñan las vías de vigilancia de

DDR para controlar directamente la reparación del ADN y la estabilidad genómica más allá de sus funciones de controlar el ciclo celular y la inducción de la muerte por apoptosis.

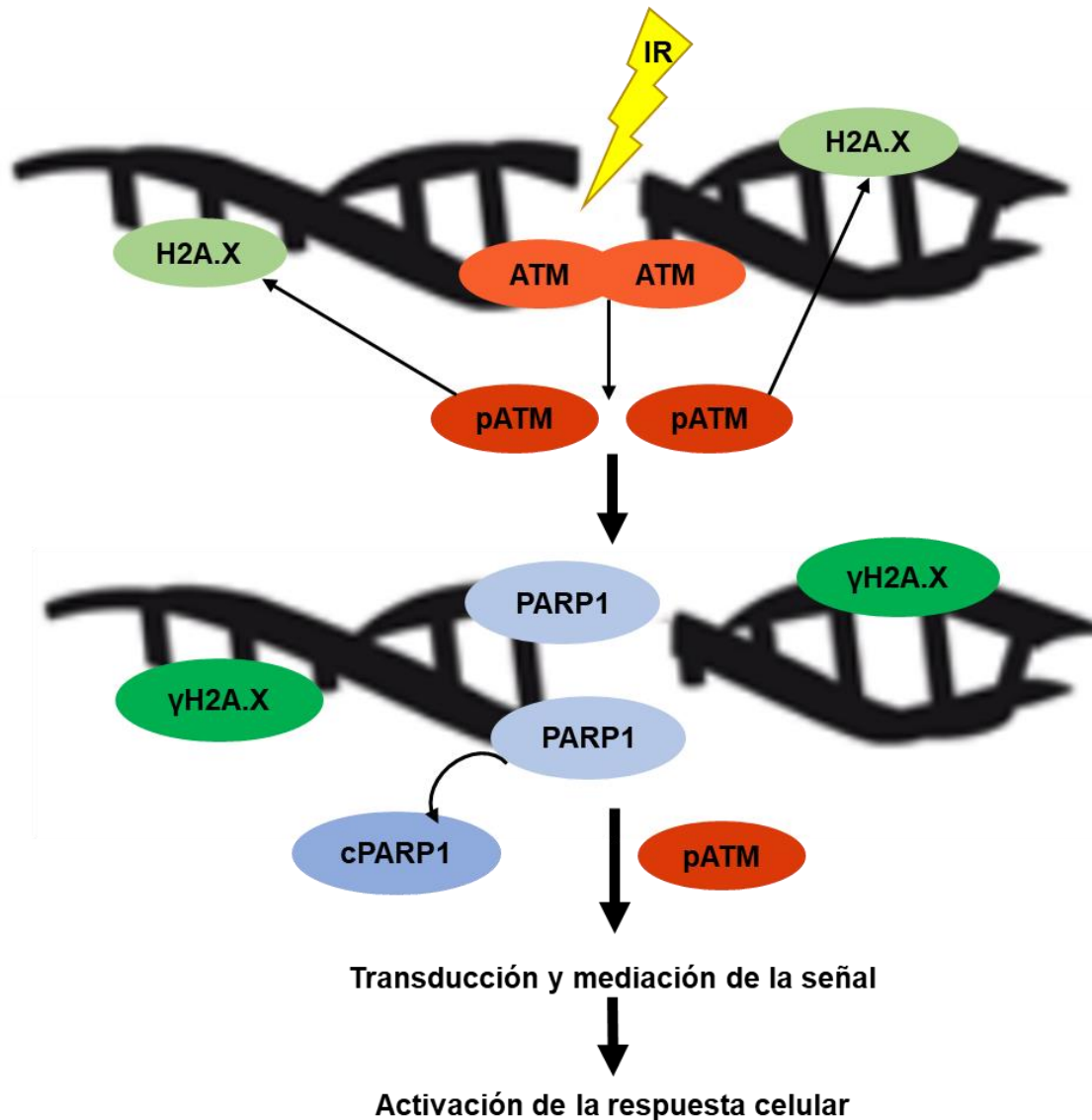


Figura 7. Sensado de la ruptura de cadena doble. Las DSB causan cambios topológicos en el ADN, lo que causa que ATM se autofosforile y se active como pATM. Esta última, fosforila a H2AX para formar γ H2A.X, la cual establece la ubicación de la DSB; pATM también fosforila a otros blancos río abajo de la señalización. Por otra parte, PARP1 también identifica la ruptura del ADN y poli(ADP)-ribosila proteínas asociadas al ADN y otras proteínas para el reclutamiento de la maquinaria de reparación, después de la poli(ADP)-ribosilación, PARP1 es escindida o cortada y se forma cPARP1 como enzima inactiva.

a) Proteína Ataxia Telangiectasia Mutada

La proteína ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) es el gen mutado en células de pacientes con la enfermedad de Ataxia Telangiectasia y es crucial para el inicio de las vías de señalización en las células después de la exposición a IR y a otros agentes que producen rupturas de cadena doble en el ADN de las células. ATM es una proteína cinasa, miembro de la familia de proteínas cinasas relacionadas con fosfatidilinositol 3-cinasa. ATM transmite el mensaje a través de varios medios, incluida la fosforilación de proteínas como la variante de histona H2A.X, p53 y el punto de control cinasa 2 (Sancar, Lindsey-Boltz, Ünsal-Kaçmaz, y Linn, 2004). La exposición de las células a IR desencadena la actividad cinasa de ATM, y esta función es necesaria para la detención de las fases del ciclo celular. La actividad de ATM se modula por modificaciones postraduccionales, principalmente la fosforilación. La activación no se lleva a cabo al unirse directamente a las rupturas de la cadena de ADN, sino que se propone que estas rupturas causan rápidamente cambios topológicos en la estructura de la cromatina, lo que inicia la autofosforilación y activación de ATM (pATM) (Bakkenist y Kastan, 2003). ATM existe como un dímero en células no perturbadas, y esa autofosforilación intermolecular en la serina 1981 es necesaria para la disociación del dímero. Después del daño, el dominio de cinasa de una molécula de ATM fosforila a la serina 1981 de la molécula de ATM con la que interactúa; una vez fosforilada, se disocia el complejo liberándose pATM para fosforilar otros sustratos río abajo. Las mutantes inactivas de ATM, no susceptibles de fosforilación, retienen ATM en complejo endógeno después de IR, lo que inhibe su actividad. Este mecanismo proporciona una explicación para la propiedad inhibitoria dominante de ATM sin actividad cinasa, una propiedad que muchos laboratorios han utilizado de manera ventajosa, pero que hasta ahora no se ha comprendido (Bakkenist y Kastan, 2003; Kurz y Lees-Miller, 2004).

b) Variante X de la histona 2A

H2A.X es una variante de la histona H2A denominada X que, junto con otras histonas, forma parte de los nucleosomas que empaquetan al ADN. Diversos estudios han indicado que algunas variantes de las histonas tienen funciones biológicas especializadas más allá del empaquetamiento del ADN en nucleosomas. La variante H2A.X desempeña una función importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y ha sido estudiada extensivamente en la respuesta a daño al ADN. H2A.X constituye una de las principales especies de H2A, y sus niveles varían de 2 a 25% del grupo de histonas H2A de los mamíferos, según la línea celular o el tejido examinado. Al igual que otros miembros de la familia H2A, el H2A.X se puede fosforilar en Ser 139, acetilar en Lys 5 y ubiquitinarse en Lys 119. Pero lo que hace que H2A.X sea única es precisamente el residuo 139 de serina altamente conservado ubicado en el extremo carboxilo terminal que se fosforila rápidamente después la generación de DSB en el ADN, principalmente por IR (Fernandez-Capetillo, Lee, Nussenzweig, y Nussenzweig, 2004; Redon et al., 2002). En la nomenclatura estructural, la fosforilación se produce en el oxígeno en la posición gamma de la serina, por lo que la forma modificada se conoce ampliamente como γ H2A.X. Esta fosfoproteína γ H2A.X se concentra rápidamente alrededor de DSB en centros denominados *focis* o focos que pueden extenderse hasta un rango de hasta 2 millones de pares de bases del sitio del daño (Pinto y Flaus, 2010)

Cuando H2A.X es fosforilada ayuda a reclutar múltiples componentes de la respuesta a daño al ADN en el sitio de la DSB e iniciar su reparación. La deficiencia de H2A.X *in vivo* ha sido relacionada con la inestabilidad genómica y radiosensibilidad. Además, la abundancia de H2A.X en la cromatina se ha relacionado con el estado indiferenciado de las células. En células embrionarios de ratón, H2A.X es abundante y el nivel disminuye con la diferenciación (Nashun, Akiyama, Aoki, Yukawa, y Liu, 2010), por lo que puede ser indicativo de un estado de indiferenciación, y a su vez proliferativo, en células eucariotas (Shechter et al., 2009).

c) Proteína Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1

La proteína Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1 (PARP1) es una proteína de unión al ADN mediante dedos de zinc y es la enzima responsable de aproximadamente el 90% de la actividad ADP-ribosil transferasa autodirigida en células humanas no transformadas y malignas. La familia de las enzimas PARP contiene dieciocho miembros, siendo la primera en caracterizarse PARP1, la cual emplea NAD⁺ como cofactor para ADP-ribosilar sus proteínas blanco y, por lo tanto, controla un conjunto diverso de funciones biológicas. El primer papel definido para PARP1 fue organizar la resolución de daños en el ADN, especialmente en el contexto de la reparación por escisión de bases. Estudios posteriores implicaron que PARP1 poseía otras funciones que incluyen: reparación del ADN y mantenimiento de la integridad genómica, metilación del ADN, regulación de los ciclos circadianos, modificación de las histonas y regulación de la estructura de la cromatina y recientemente se asocia con la regulación de la transcripción de genes (Gilabert et al., 2014; Schiewer y Knudsen, 2014).

Para catalizar la poli(ADP)-ribosilación de esta variedad de proteínas se usa NAD⁺ como sustrato y se ha sugerido que PARP1 contribuye a la muerte celular al agotar las reservas de NAD⁺ y ATP en la célula. Posteriormente, se demostró que PARP1 es escindida o cortada (cPARP1) por Caspasa-3, durante la apoptosis inducida por fármacos, en dos fragmentos de 89 y 24 kDa, los cuales contienen el sitio activo y el dominio de unión al ADN, respectivamente. Dicha escisión esencialmente inactiva la enzima al destruir su capacidad para responder a las roturas de la cadena del ADN; y también se propone que la formación de cPARP podría servir para prevenir el agotamiento de NAD⁺ y ATP en la célula (Boulares et al., 1999).

Por otra parte, algunos reportes han mostrado una asociación entre la sobreexpresión de PARP1 y un pronóstico adverso en cáncer de mama (Gonçalves et al., 2011; Von Minckwitz et al., 2011), así como con la radiorresistencia en cáncer cervicouterino (Kumazawa et al., 2014); por lo que han surgido los inhibidores de PARP1 como recursos para el tratamiento del cáncer (Curtin y Szabo, 2013)

Los tratamientos oncológicos con radioterapia aun fallan en cáncer en estadios avanzados a pesar de los avances científicos y tecnológicos, por lo que aún es primordial lograr identificar en la células cancerosas aspectos que permitan radiosensibilizarlas a través de las vías que sensan el daño en el ADN y modulando la respuesta a nivel molecular resultante de este daño al ADN por la radiación (Kirsch et al., 2018).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ampliar los conocimientos sobre los mecanismos y factores responsables de las distintas respuestas que tiene la célula ante el daño al ADN resulta importante, sobre todo en las células troncales cancerosas a las cuales se les atribuye la resistencia a la terapia oncológica. En este trabajo se plantea evaluar la presencia de componentes de las etapas de sensado y de transducción de la señal de daño al ADN; estos componentes podrían ser relevantes en la activación de los mecanismos para la sobrevivencia celular después de causarles daño en el ADN y podrían constituir algún blanco terapéutico que logre sensibilizar selectivamente a las células troncales cancerosas a la radiación.

Pregunta de investigación:

¿Por qué las células troncales cancerosas responden al daño en el ADN con mayor eficiencia que el resto de las células tumorales?

5. HIPÓTESIS

Los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas tienen mayores niveles, que los cultivos no enriquecidos, de las proteínas ATM, pATM, PARP1, cPARP1 y γ H2A.X; las cuales son componentes importantes en las etapas de sensado y transducción de la señal de daño al ADN en la vía de respuesta a daño al ADN.

6. OBJETIVOS

6.1. GENERAL

- Establecer la diferencia en la expresión de los componentes de etapa de sensado y la respuesta a daño al ADN entre cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas y cultivos no enriquecidos después de la exposición a radiación ionizante.

6.2. PARTICULARES

- Obtener cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas de la línea celular HeLa, derivada de cáncer cervicouterino, y de la línea celular MCF-7, derivada de cáncer de mama, mediante el ensayo de formación de esferas.
- Determinar la sensibilidad a la radiación ionizante de los cultivos en monocapa y de los cultivos de esferas enriquecidos en células troncales cancerosas.
- Determinar la presencia de las proteínas ATM, pATM, PARP1 y cPARP1 en los cultivos en monocapa y de esferas de la línea celular HeLa antes y después de la exposición a radiación ionizante, mediante western blot.
- Evaluar la progresión del ciclo celular y la proliferación de los cultivos en monocapa y de esferas de HeLa en respuesta a la exposición a radiación ionizante, mediante citometría de flujo.
- Determinar la presencia de pATM y γ H2A.X en los cultivos en monocapa y de esferas de las líneas celulares HeLa y MCF-7 antes de la radiación ionizante, mediante inmunofluorescencia.

7. METODOLOGÍA

7.1. CULTIVOS CELULARES

7.1.1. Cultivos en monocapa

Las líneas celulares HeLa, derivada de cáncer cervicouterino, y MCF-7, derivada de cáncer de mama, crecen en monocapa y para su proliferación se emplearon los medios de cultivo DMEM y DMEM F-12 respectivamente utilizando placas adherentes; ambos medios suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomycin y 100 UI/mL de penicilina. Se mantuvieron en la incubadora a 37 °C con un ambiente humedecido y con 5% de CO₂. Los cultivos se emplearon para experimentación durante sus etapas de crecimiento con confluencia entre el 70 y el 80%. De acuerdo a la identificación de CD49f y a la medición de la actividad de ALDH, los cultivos en monocapa se consideraron como cultivos no enriquecidos en células troncales cancerosas, nombrándose HeLa ML al cultivo de células HeLa y MCF-7 ML al cultivo de células MCF-7.

7.1.2. Cultivos de esferas

Las células crecidas en monocapa fueron disociadas empleando tripsina al 0.05 % incubando a 37°C durante 5 minutos, después lavadas y resuspendidas al final con solución salina de fosfatos amortiguada (PBS). Posteriormente, estas células se sembraron a una baja densidad de 3000 células/mL en placas de cultivo de ultra-baja adherencia empleando el medio de cultivo comercial llamado *MammoCult™ Human Medium* (Stemcell Technologies). La composición del medio *MammoCult™* consiste en el medio de crecimiento basal, 10 % del reactivo *MammoCult™ Proliferation Supplement (Human)*, 4 µg/mL de heparina y 0.48 µg/mL de hidrocortisona, adicionalmente se agregó 100 µg/mL de estreptomycin y 100 UI/mL de penicilina. Una vez sembradas las células, se colocaron en la incubadora a 37 °C, con un ambiente humedecido y con 5% de CO₂. Después de 4 días de crecimiento, el cultivo obtenido consistió en células organizadas en estructuras con forma de esfera que estaban en suspensión en el medio de cultivo. De acuerdo con la identificación de CD49f y a la medición de la actividad de ALDH, los cultivos de esferas se consideraron como cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas, nombrándose HeLa SP al cultivo de células HeLa y MCF-7 SP al cultivo de células MCF-7.

7.2. IDENTIFICACIÓN DE CD49f Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALDH

Los cultivos en monocapa fueron disociados con verseno (EDTA a 200 mg/L en PBS) incubando a 37°C durante 5 minutos, los cultivos de esferas fueron disociados por acción mecánica de la micropipeta. Ambos tipos de cultivo fueron lavados y resuspendidos en solución amortiguada para citometría de flujo denominada *flow buffer* (0.05% BSA y 2 mM de EDTA en PBS). Para la identificación de la proteína CD49f, los cultivos de HeLa ML y HeLa SP fueron incubados con el anticuerpo CD49f-PE (BD Biosciences, 555736) a 4°C durante 30 minutos a una dilución 1/40 en *flow buffer*, el anticuerpo ya estaba acoplado al fluorocromo ficoeritrina (PE). Posteriormente, los cultivos se lavaron y resuspendieron nuevamente en *flow buffer* manteniéndose a 4°C hasta su lectura.

Para evaluar la actividad de la enzima ALDH se empleó el kit comercial Aldefluor™ (*Stemcell Technologies*, 01700) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. En breve, después de la disociación de las células en monocapa y de esferas, hasta 1 millón de células fueron resuspendidas en la solución *Aldefluor™ buffer*, luego fueron mezcladas con el reactivo *Aldefluor™ reagent* e inmediatamente, la mitad del volumen inicial de la suspensión de células fue transferido a un tubo que contenía el reactivo *Aldefluor™ DEAB*. Ambas mezclas se incubaron a 37°C en un baño de agua durante 40 minutos, después se centrifugaron, el sobrenadante fue eliminado, se resuspendieron en *Aldefluor™ buffer* y se mantuvieron a 4°C hasta su lectura. *Aldefluor™ reagent* es el sustrato que después de ser metabolizado por la enzima ALDH genera un producto fluorescente, *Aldefluor™ DEAB* es un inhibidor de la enzima ALDH y permite identificar a la población celular que no tendría actividad de la enzima.

Para que simultáneamente se pudiera identificar a CD49f y medir la actividad de ALDH, primero se realizó el procedimiento para medir la actividad de ALDH y después se hizo la tinción con el anticuerpo CD49f-PE. En este último caso, la tinción de CD49f se realizó empleando *Aldefluor™ buffer* en lugar de *flow buffer*. Las muestras se mantuvieron en frío a 4°C hasta su lectura. Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo *Beckman Coulter Cytometer*, la señal de CD49f-PE se identificó en el canal de

ficoeritrina (FL-2) y la señal de la actividad ALDH se identificó en el canal de isotiocianato de fluoresceína (FL-1). Los datos fueron analizados con el programa FlowJo®.

7.3. EXPOSICIÓN A RADIACIÓN IONIZANTE

Las células de los cultivos en monocapa fueron disociadas con tripsina y las de las esferas fueron disociadas de manera mecánica con la micropipeta, las células de ambos cultivos se mantuvieron en suspensión en sus respectivos medios de crecimiento. Las células fueron expuestas a IR utilizando un equipo auto blindado que contiene una fuente de Cesio 137 la cual emite rayos gama con una tasa de emisión de 4.056 Gy/min con baja LET (Gammacell 1000 Elite Nordion, IIB-UNAM). La dosis de radiación abarco desde los 0 Gy hasta los 10 Gy, los cultivos fueron mantenidos en hielo antes de la radiación y después de ella fueron incubadas a 37 °C para permitir su recuperación a diferentes tiempos. Para realizar las evaluaciones posteriores, los cultivos de HeLa ML se expusieron a una dosis de 1.5 Gy, mientras que HeLa SP se expusieron a 6.0 Gy; estas dosis fueron cercanas a sus respectivas dosis letales medias, las cuales fueron determinadas mediante la evaluación de la fracción sobreviviente a IR.

7.4. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOBREVIVIENTE A IR

Después de la exposición de las células a las dosis de 0, 3, 5, 8 y 10 Gy de IR se realizaron cultivos a baja densidad celular.

Del cultivo en monocapa se sembraron 500 células/pozo en placas de 6 pozos utilizándose tres pozos por dosis de radiación. Después de 14 días, las colonias formadas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con cristal violeta al 0.5%. Del cultivo en esferas, se sembraron 100 células/pozo en placas de 96 pozos de ultra-baja adherencia utilizándose 12 pozos por dosis de radiación. Después de 7 días de crecimiento, las nuevas esferas fueron contadas.

Tanto las colonias en la monocapa, como las esferas formadas en suspensión, debían superar los 70 μ m. Para calcular la fracción de sobrevivencia (SF) se emplearon las ecuaciones (1) y (2), en donde la eficiencia de plaqueo (EP) es la fracción de células

sin radiación que forman una colonia o una esfera. El cultivo a baja densidad celular para la monocapa se evaluó hasta los 14 días para hacer más evidente el crecimiento de las colonias; sin embargo, a los 7 días ya se tenía el número final de colonias formadas. Para el caso de las esferas, el ensayo se realizó a 7 días debido a que después de este tiempo se forman agregados de esferas que imposibilitan distinguir esferas individuales. La dosis letal media (LD50) fue calculada empleando un modelo matemático exponencial.

$$EP = \frac{\text{Número de colonias o esferas del control}}{\text{Número de células sembradas}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$SF = \frac{\text{Número de colonias o esferas formadas después de la radiación}}{(\text{Número de células sembradas})(EP)} \dots\dots \text{Ecuación 2}$$

7.5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Después de la exposición a las dosis de IR, los cultivos fueron incubados de 0 a 24 horas y después fijados con paraformaldehído al 2% durante 5 minutos y se permeabilizaron con metanol a -20 °C durante 20 minutos. Las células se resuspendieron durante 40 minutos en la solución de tinción que contiene 5 µg/mL de yoduro de propidio el cual se intercala con ácidos nucleicos de cadena doble, 10 µg/mL de RNAsa A con la finalidad de degradar ARN que pueda estar presente en forma de cadena doble y para favorecer la permeabilidad hacia el núcleo celular se utilizó 0.5 % de Triton X-100 en solución amortiguada de fosfatos. Las células fueron leídas en un citómetro de flujo Attune Azul/Violeta y los datos analizados con el programa FlowJo®.

7.6. INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Se realizó una extracción de proteína total mediante una solución de lisis (50 mM de Tris Base, 5 mM de EDTA, 133 mM de NaCl, 1 mM de PMSF y 1% de Triton X-100). La cuantificación se realizó usando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* y las proteínas fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis. Se empleó electroforesis en gel desnaturizante (*SDS-PAGE*) para separar las proteínas y se transfirieron a membranas

de nitrocelulosa. Se bloquearon con albumina sérica bovina (BSA) al 5%, después se incuban con el respectivo anticuerpo primario a 4 °C durante 14 a 18 horas, seguido de la exposición a su respectivo anticuerpo secundario que estaba acoplado a HRP y finalmente, se evidenció la presencia de las proteínas empleando el sustrato quimioluminisciente luminol y el equipo C-DiGit que detecta esta luminiscencia. Los anticuerpos primarios empleados fueron: ATM (Abcam, ab78), pATM (Abcam, ab36810), PARP1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8007), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-48167), y β -Actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), los anticuerpos secundarios fueron *goat anti-mouse IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) y *donkey anti-goat IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020). β -Actin y GAPDH fueron empleados como controles de carga de la cantidad de proteína.

7.7. INMUNOFLUORESCENCIA

Después de la exposición a IR, los cultivos fueron regresados a la incubadora para permitir su recuperación 0.5 y 1 hora. Después de la incubación, los cultivos fueron resuspendidos y fijados con paraformaldehído al 2% durante 5 minutos, resuspendidos en solución amortiguada de fosfatos y después adheridas a laminillas de vidrio mediante centrifugación usando un CytoSpin. Las células fueron inmunoteñidas con los anticuerpos primarios γ H2A.X (Abcam, ab81299) y pATM (Abcam, ab36810) overnight a 4 °C, después se les colocó el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, *goat anti-rabbit IgG-FITC* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2012) o *goat anti-mouse IgG-Fluorescein* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2010). Finalmente fueron montados utilizando el medio de montaje Vectashield que contiene DAPI y las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio invertido Olympus IX71 o el microscopio confocal Nikon A1R+STORM y analizadas con los programas ImageJ y NIS-Elements Viewer.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de student a través del programa GraphPad Prism. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS

8.1. LOS CULTIVOS DE ESFERAS SE ENCUENTRAN ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Con el ensayo de formación de esferas, los cultivos crecidos en condiciones no adherentes y con un medio específico, se obtuvieron cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas (CSC) de líneas de células tumorales cultivadas como monocapa. Empleando esta estrategia, se obtuvieron cultivos de CSC de la línea celular HeLa que crecieron como esferas (HeLa SP) encontrándose que el 87% de las células de los cultivos de HeLa SP eran positivas para CD49f, mientras que el 80% de las células de HeLa cultivadas como monocapa (HeLa ML) eran negativas para CD49f (Figura 8). La expresión de CD49f y la actividad de ALDH simultáneamente estuvo presente en el 11% de la población que creció como esferas, mientras que solo el 0.64% de la población que creció como monocapa fue positiva.

8.2. LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS MUESTRAN MENOS SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE

La determinación de la sensibilidad a la radiación ionizante (IR) demostró que los cultivos de esferas eran menos sensibles a la radiación que los cultivos de monocapa de la línea celular HeLa. Como se esperaba, ambas condiciones de crecimiento de las líneas celulares revelaron una disminución progresiva de la sobrevivencia con una dosis creciente de IR, pero los cultivos de CSC mostraron una menor sensibilidad. Los cultivos de HeLa ML no sobrevivieron después de haber sido expuestos a dosis superiores a 5 Gy, mientras que los cultivos de HeLa SP sobrevivieron hasta la dosis de 6 Gy (Figura 9a). A través de un modelo matemático exponencial, fue posible calcular la dosis letal media (LD50) de cada cultivo; para HeLa ML fue de 1.6 Gy, para HeLa SP fue de 4.2 Gy (Figura 9b). La LD50 de los cultivos de CSC fue mayor que la LD50 de los cultivos en monocapa. La eficiencia de plaqueo (PE) de HeLa ML fue de 47.2% y de 39.0% para HeLa SP.

La fracción sobreviviente de HeLa SP se reportó a los 7 días después de la radiación, a este mismo tiempo también se evaluó la sobrevivencia de HeLa ML; sin embargo, para hacer evidente el tamaño de las colonias sobreviviente, se permitió el crecimiento hasta los 14 días. La fracción sobreviviente de HeLa ML no cambió entre el día 7 y el día 14

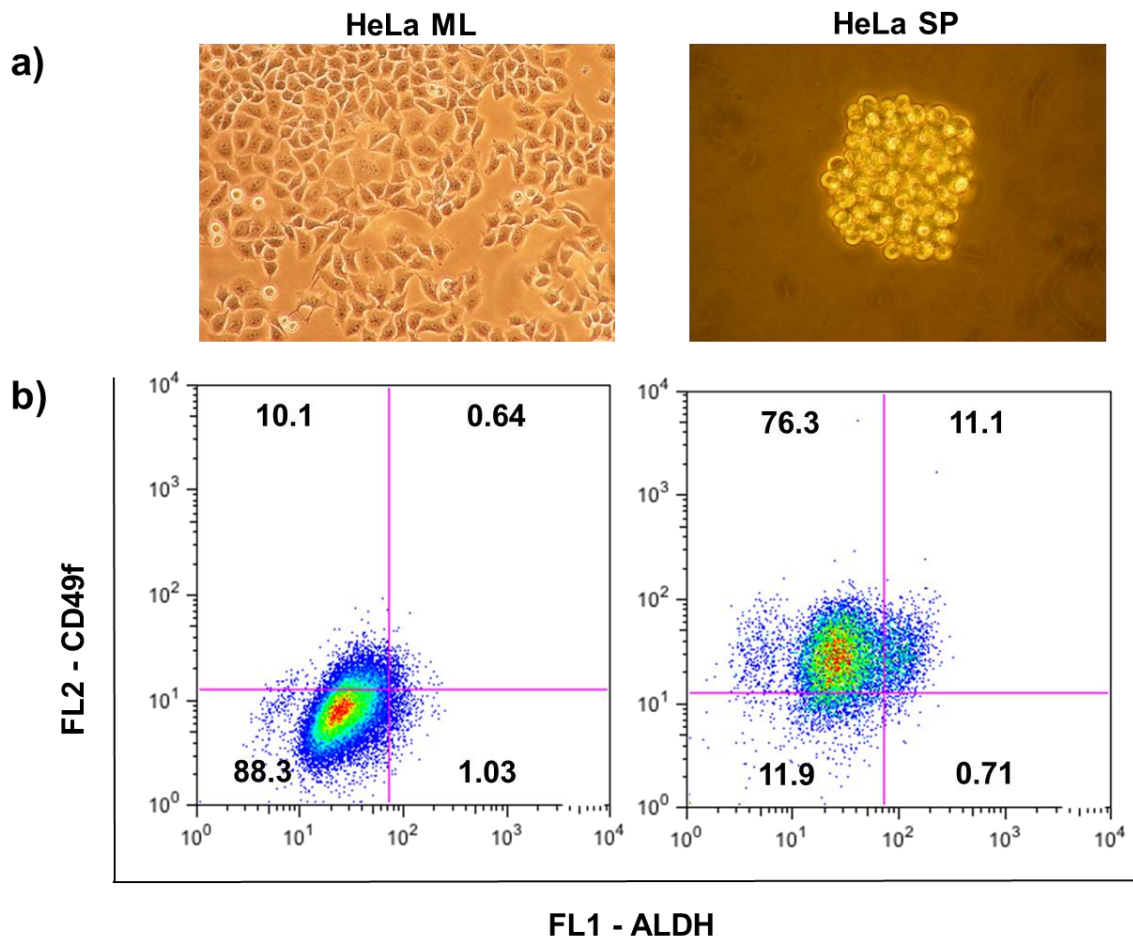


Figura 8. Los cultivos de esferas se enriquecen en CSC de HeLa. a) Imágenes de microscopía que muestran los cultivos derivados de la línea celular HeLa crecidos como monocapa (HeLa ML) y como esferas (HeLa SP), objetivos de 20X y 40X respectivamente. b) Las gráficas muestran el enriquecimiento en CSC en el cultivo de esferas, donde el porcentaje de células que son positivas para la proteína CD49f y la actividad ALDH. El análisis indica que, del cultivo de esferas, el 87.4 % (76.30 % y 11.10 %) de las células son positivas para CD49f, el 11.81 % (11.1 % y 0.71 %) posee alta actividad ALDH, mientras que el 11.10 % son positivas para ambos marcadores y solo el 11.90 % es negativa para ellos. Por otra parte, en los cultivos en monocapa el 10.74 % (10.10 % y 0.64 %) de las células son positivas para CD49f, el 1.67 % (0.64 % y 1.03 %) posee alta actividad ALDH, solo el 0.64 % son positivas para ambos marcadores, mientras que el 88.30 % son negativas.

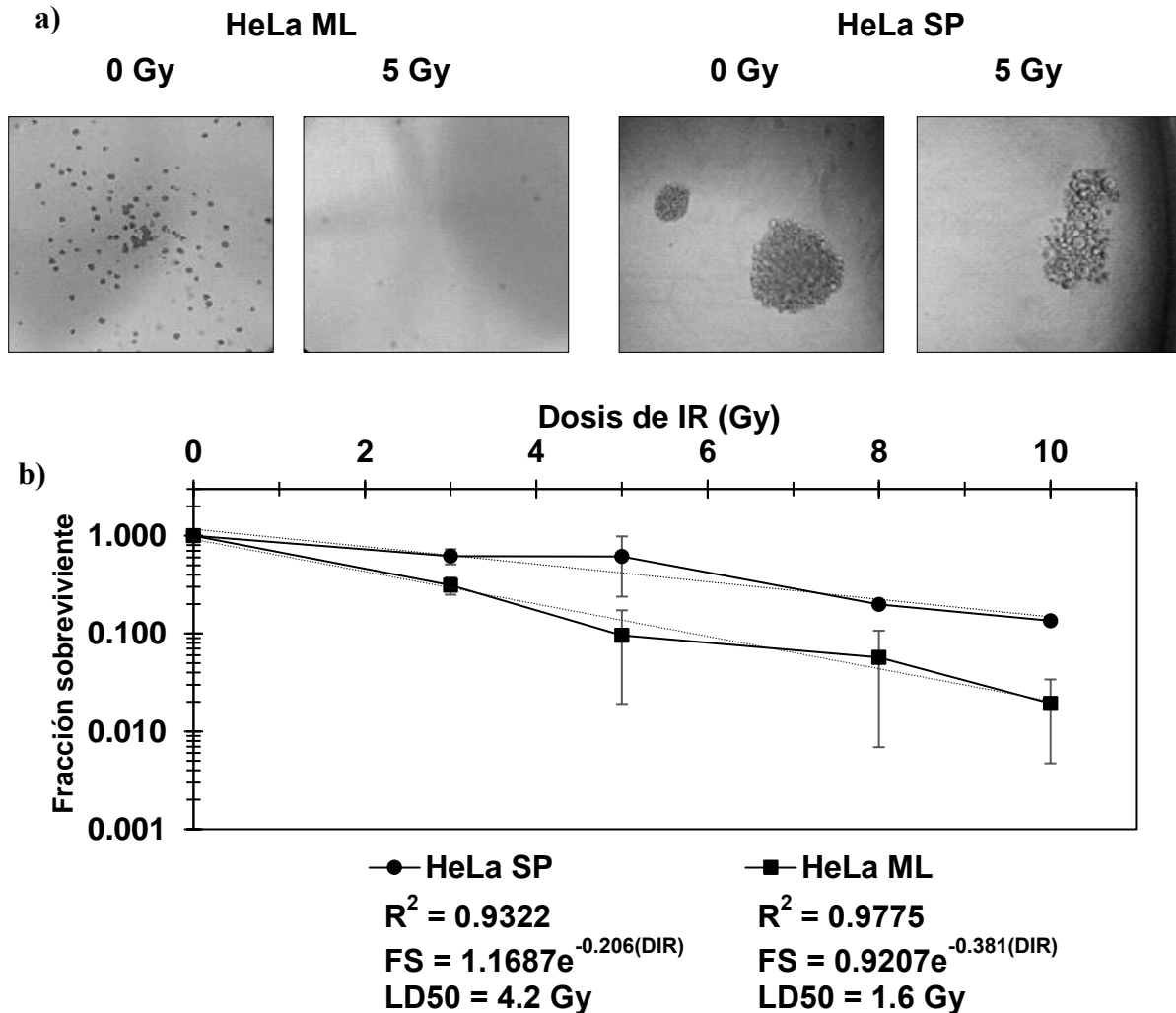


Figura 9. Los cultivos de esferas de HeLa son menos sensibles a la radiación ionizante. a) La determinación de la fracción sobreviviente a IR por cultivos a baja densidad celular indicó que, con una dosis de 5 Gy de IR, HeLa ML muere, mientras que HeLa SP continuó proliferado. Objetivo de 4X y 40X respectivamente. b) Los datos de sobrevivencia después de la exposición a IR muestran que HeLa SP tiene mayor fracción de células que sobrevive que HeLa ML. La dosis letal media (LD50) fue calculada usando un modelo matemático exponencial. Los datos graficados se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media de al menos dos experimentos independientes. DIR: Dosis de radiación ionizante.

8.3. LOS CULTIVOS DE ESFERAS Y MONOCAPA DETIENEN DEL CICLO CELULAR EN TIEMPOS SIMILARES DESPUES DE LA EXPOSICIÓN A IR

Se examinaron los posibles cambios en el ciclo celular de los cultivos HeLa SP y HeLa ML hasta 24 h después de la radiación. Los cultivos de HeLa ML y HeLa SP detuvieron el ciclo celular en la fase G₂/M entre 9 y 12 h después de la exposición a la dosis de IR; se observó una acumulación del 64% de la población celular en HeLa ML y del 83% en HeLa SP (Figura 10). Es muy importante destacar que los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas, después de haber detenido su ciclo celular, continuaron proliferando. A pesar de que los cultivos en monocapa restablecieron el ciclo celular, no pudieron continuar proliferando a largo plazo como se mostró en la determinación de la fracción sobreviviente a IR con cultivo a baja densidad celular.

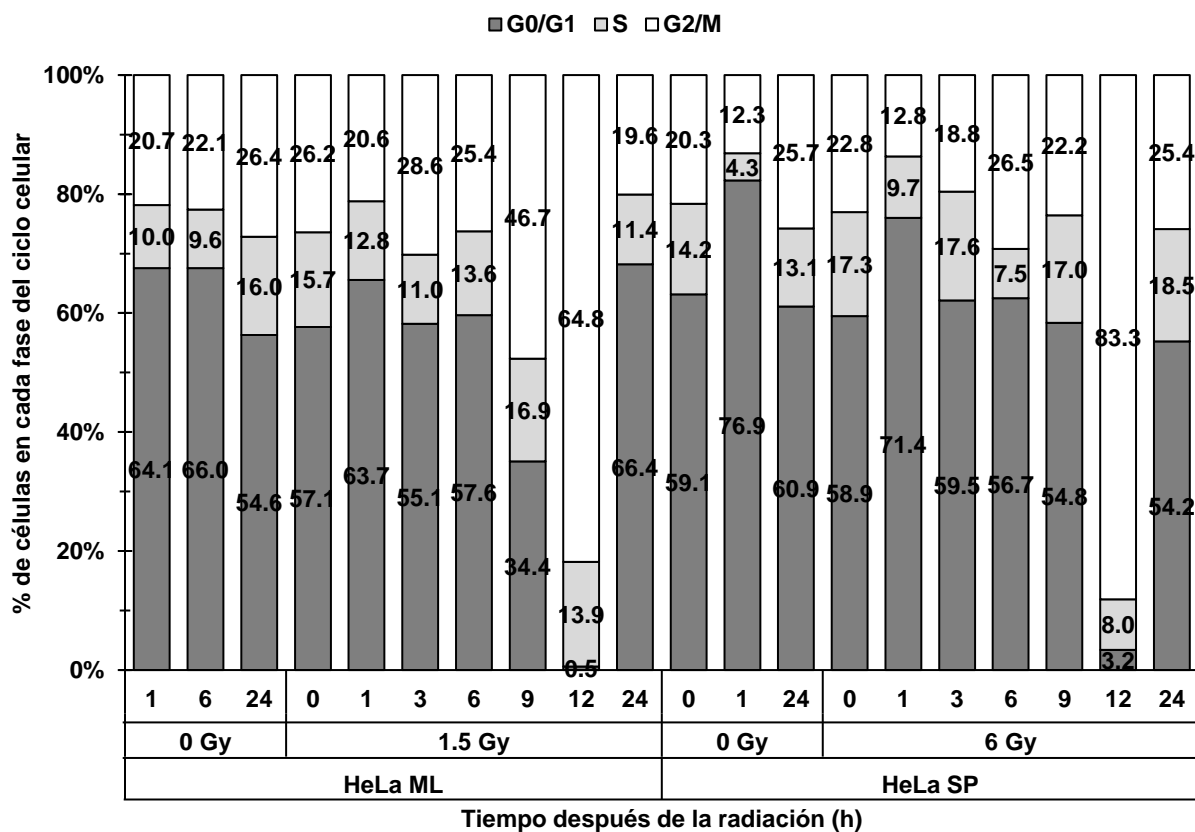


Figura 10. Los cultivos de esferas y monocapa detienen el ciclo celular en tiempos similares. Los cultivos de esferas y en monocapa de HeLa detuvieron el avance del ciclo celular entre 9 y 12 horas después de la exposición a IR; aunque ambos cultivos restauraron sus ciclos celulares después de 12 horas, solo los cultivos de esferas continuaron proliferando por más tiempo. Los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes.

8.4. ATM Y PARP1 PERMANECEN ACTIVAS EN LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CSC DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A IR

Se compararon los niveles de expresión de ATM en cultivos de HeLa ML y HeLa SP antes y después de la exposición a IR. Se encontró que los cultivos de HeLa SP tenían un mayor nivel de expresión de ATM que los cultivos de HeLa ML así como de su versión fosforilada y activada (pATM) antes de la exposición a IR. Cuando los cultivos de HeLa ML se expusieron a una dosis de 1.5 Gy de IR, las proteínas ATM y pATM aumentaron entre 2 y 3 veces. Mientras que cuando HeLa SP se expuso a 6 Gy de IR, el nivel de expresión de ATM parece incrementar ligeramente, pero el nivel de pATM no cambia, después de la IR, la cantidad de pATM permanece constante (Figura 11).

Por otro lado, los cultivos de HeLa SP y HeLa ML sin exposición a IR no mostraron diferencias en el nivel de la proteína PARP1. Sin embargo, el nivel de proteína PARP1 escindida o cortada (cPARP1) fue 3 veces mayor en HeLa SP antes de la radiación. Cuando HeLa ML y HeLa SP se expusieron a las dosis de IR, los niveles de PARP1 continuaron sin cambios durante 3 h entre los cultivos tratados y los no tratados. Pero no así con los niveles de cPARP1 siendo diferentes entre los cultivos tratados y los no tratados. HeLa SP continuó teniendo más proteína cPARP1 que HeLa ML después de la exposición a su dosis de IR (Figura 12).

Es importante destacar que los cultivos de esferas a una dosis de 6 Gy de IR responden de manera similar a los cultivos de monocapa a una dosis de 1.5 Gy de IR.

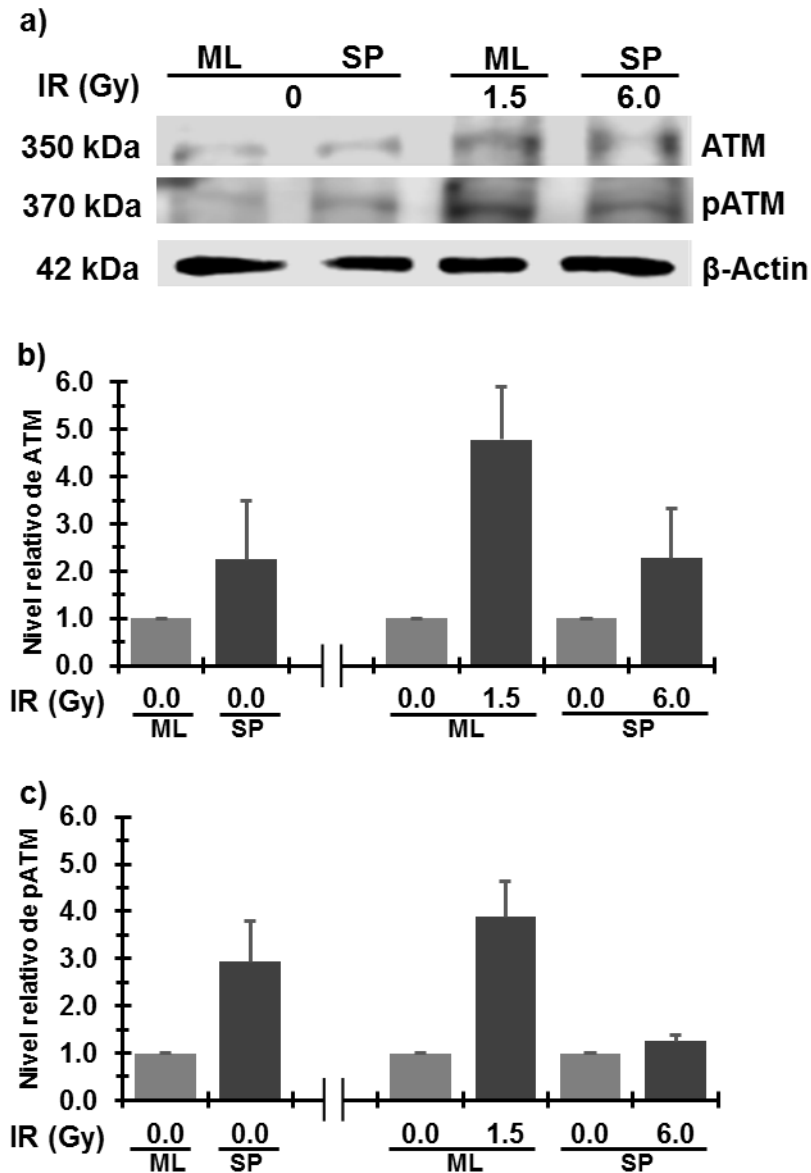


Figura 11. El nivel de expresión de ATM y pATM es mayor en los cultivos enriquecidos en CSC. a) Inmunoblot representativo que muestra la expresión global de ATM y su versión fosforilada (pATM) en los cultivos de monocapa y de esferas antes y 3 horas después de la exposición a IR. b) Sin exposición a IR, los cultivos de HeLa SP tuvieron mayor nivel de la proteína ATM que los cultivos de HeLa ML. Después de la exposición a IR, la expresión ATM aumentó en ambos cultivos. c) Sin exposición a IR, los cultivos de HeLa SP tuvieron un nivel más alto de pATM que los cultivos de HeLa ML. Después de la exposición a IR, solo los cultivos HeLa ML tuvieron un aumento de pATM. Se utilizó β -Actina como control de carga y con el cual se normalizo el nivel de cada proteína por densitometría. El nivel normalizado de proteínas se expresó como media \pm error estándar de la media en al menos dos experimentos independientes.

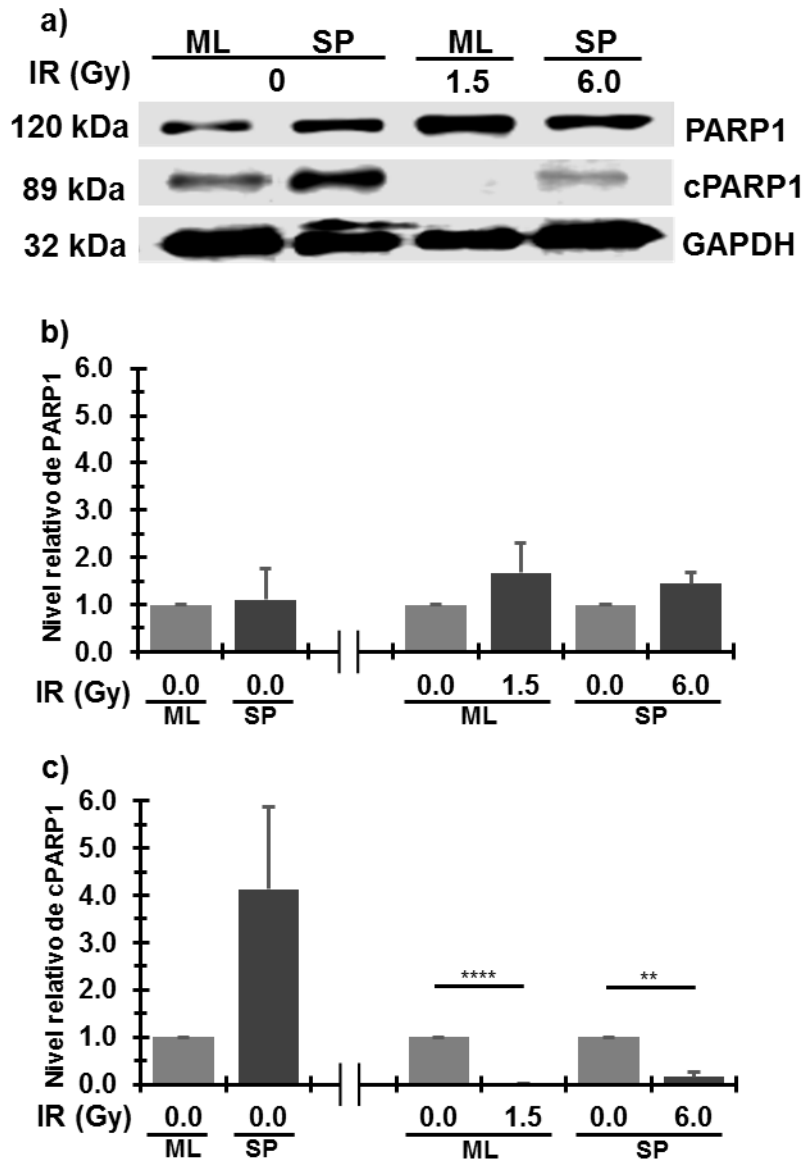


Figura 12. El nivel de expresión de cPARP1 es mayor en los cultivos enriquecidos en CSC. a) Inmunoblot representativo que muestra la expresión global de PARP1 y su versión escindida (cPARP1) en cultivos HeLa SP y HeLa ML antes y 3 h después de la exposición a IR. b) Los cultivos de HeLa SP y HeLa ML no mostraron diferencias en el nivel de proteína de PARP1 antes y después de la exposición a IR. c) Los cultivos de HeLa SP continúan con un mayor nivel de cPARP1 que HeLa ML antes de la exposición a IR. Después de la exposición a IR, ambos cultivos tuvieron una disminución en sus niveles de cPARP1; sin embargo, HeLa SP continuó expresando cPARP1. Se utilizó GAPDH como control de carga y con el cual se normalizó el nivel de cada proteína por densitometría. El nivel normalizado de proteínas se expresó como media \pm error estándar de la media en al menos dos experimentos independientes. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

8.5. LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CSC TIENEN ACTIVA LA VÍA DE RESPUESTA A DAÑO AL ADN

La presencia de la proteína H2A.X fosforilada (γ H2A.X) y pATM en HeLa ML y HeLa SP se detectó mediante inmunofluorescencia. Los cultivos de HeLa SP tienen una mayor expresión basal de estas proteínas en comparación con los cultivos de HeLa ML sin exposición a la radiación (Figura 13a). Además, la presencia de γ H2A.X aumentó después del tratamiento con IR en ambos tipos de cultivos. Con una dosis de 1.5 Gy de IR y 1 h después de la radiación, ambos cultivos aumentaron la presencia de γ H2A.X y pATM. Siguiendo la cinética de expresión hasta 1 h después de la radiación, tanto γ H2A.X como pATM aumentaron en ambos tipos de cultivos. Sin embargo, antes del tratamiento con IR, el nivel de la proteína pATM no aparecía en los cultivos de monocapa, mientras que, en los cultivos de esfera, esto se expresaba y se incrementaba con la radiación (Figura 13b). La señal de γ H2A.X 0.5 h después de la exposición a IR fue fuerte en HeLa SP, pero menor en HeLa ML, la cual, si aumentó, pero hasta 1 h después de la exposición a IR. Se identificó a pATM en cultivos HeLa SP y HeLa ML de igual manera que γ H2A.X, el transcurso de tiempo mostró que pATM tuvo una fuerte inducción después de IR a las 0.5 y 1 h.

También se realizó el ensayo de formación de esfera para obtener cultivos de esferas enriquecidos en CSC a partir de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. En este caso, el crecimiento por formación de esferas fue suficiente para obtener cultivos de CSC derivados de MCF-7. Como era de esperarse, los cultivos de esferas de MCF-7 fueron menos sensibles a la IR. Mediante el modelo matemático exponencial se calculó la LD50 para MCF-7 ML que resultó de 1.3 Gy mientras que para MCF-7 SP fue de 4.0 Gy (Figura 14a). La eficiencia de plaqueo (PE) de MCF-7 ML fue de 90% y 10% para MCF-7 SP.

Similar a los cultivos de las células HeLa, se identificó a pATM y a γ H2A.X principalmente en los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas derivadas de MCF-7 sin exposición a IR, (Figura 14b).

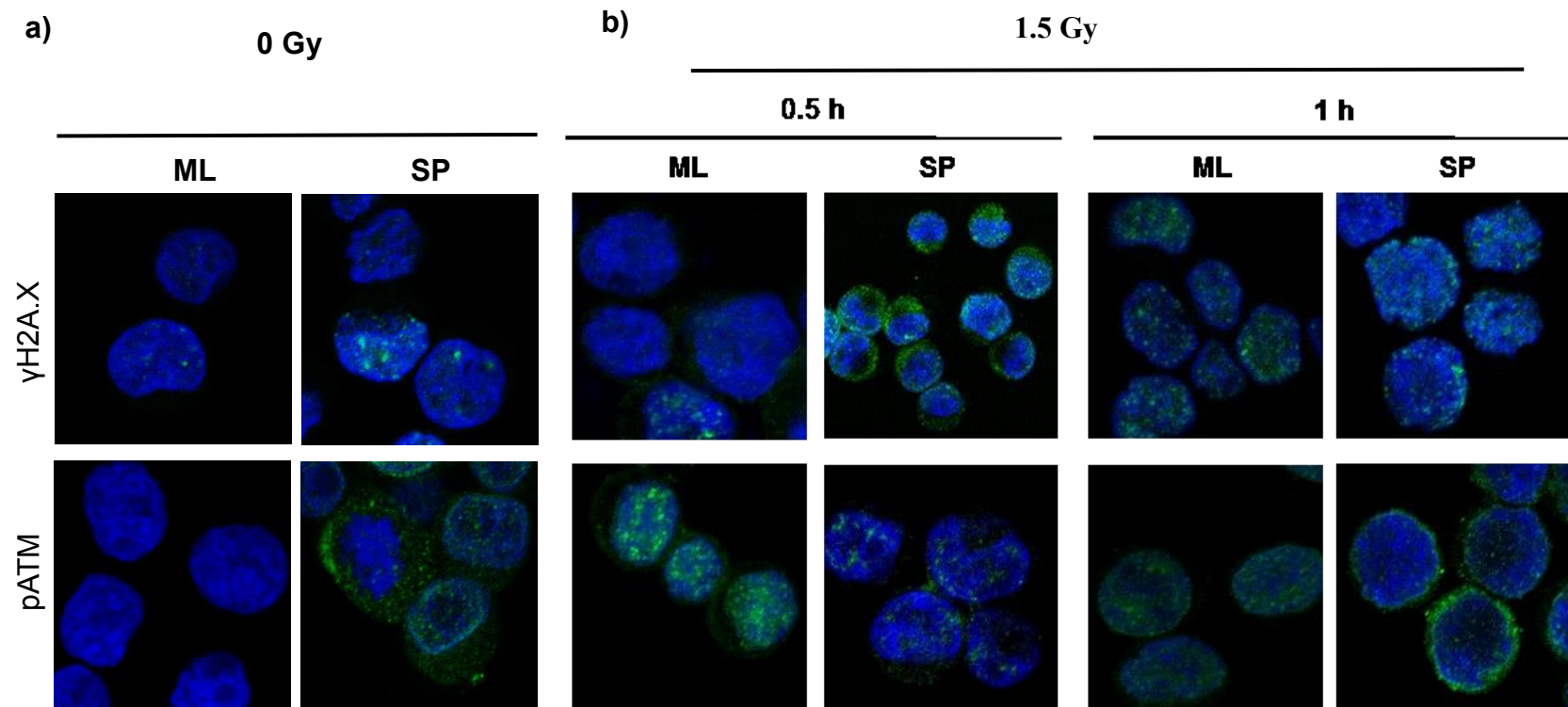


Figura 13. La presencia de pATM y γ H2A.X indica que la vía DDR se encuentra activa en loc cultivos enriquecidos en CSC.
 a) Los cultivos de HeLa SP expresaron pATM y γ H2A.X en niveles basales sin ser expuestos a IR. Objetivo 60X. b) Localización de la expresión de pATM y γ H2A.X después de 0.5 h y 1 h de exposición a IR en HeLa SP y HeLa ML. Se visualizan pATM y γ H2A.X ambos en color verde, mientras que el azul representa a los núcleos tenidos con DAPI. Las imágenes representativas del análisis microscópico indicaron que γ H2A.X se activa siempre en cultivos SP, mientras que en los cultivos ML, la activación de γ H2A.X comenzó 1 h después de la exposición a una dosis de 1.5 Gy IR. Objetivos 40X y 60X.

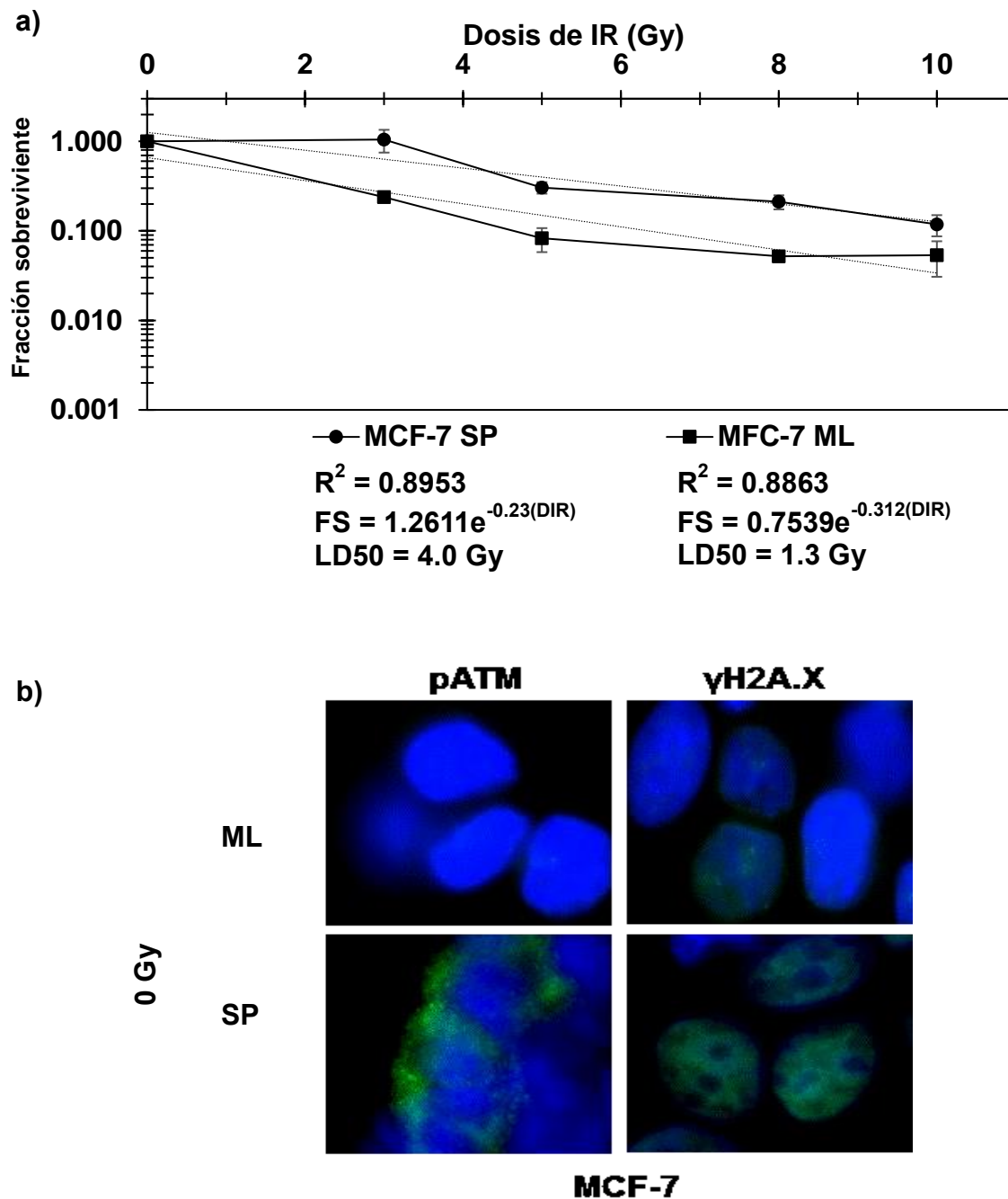


Figura 14. Los cultivos de esferas de MCF-7 son menos sensibles a la IR. a) Los datos de sobrevivencia después de la exposición a IR muestran que MCF-7 SP tiene mayor fracción de células que sobrevive que MCF-7 ML. La dosis letal media (LD50) fue calculada usando un modelo matemático exponencial. b) Los cultivos de MCF-7 SP expresaron pATM y γ H2A.X en niveles basales sin ser expuestos a IR, de igual manera que los cultivos de HeLa SP. Objetivo 60X. Los datos graficados se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media de al menos dos experimentos independientes. DIR: Dosis de radiación ionizante.

9. DISCUSIÓN

Las células troncales cancerosas (CSC), a quienes se les atribuye la resistencia a la terapia y la recurrencia tumoral en diferentes tipos de cáncer, se están estudiando para ampliar el conocimiento sobre las bases moleculares y celulares de los eventos que han bloqueado su eliminación completa de los tumores. De acuerdo con diferentes informes, una estrategia utilizada para obtener cultivos enriquecidos en CSC comprende el ensayo de formación de esferas y para caracterizar a estas poblaciones, se han reportado varios marcadores. En el caso de cáncer cervicouterino se encuentran la proteína CD49f y la actividad ALDH (Bortolomai et al., 2010; Feng et al., 2009; Gu, Yeo, McMillan, y Yu, 2011; Li, Xu, Fu, y Luo, 2014; Liu y Zheng, 2013; López et al., 2012; Ortiz-Sánchez et al., 2016). Por lo que en este trabajo se empleó el ensayo de formación de esferas para obtener cultivos enriquecidos en CSC a partir de la línea celular HeLa derivada de cáncer cervicouterino, y se caracterizó determinando de manera simultánea la presencia de CD49f y la actividad ALDH, siendo este el primer reporte de esta determinación simultánea. Con estos datos se confirma que el modelo de los cultivos de esfera, establecido en el laboratorio, está compuesto o enriquecido en células con el fenotipo CD49 positivo y con alta actividad ALDH que caracteriza a células troncales a diferencia de los cultivos de células tumorales en monocapa. Del mismo modo, con el ensayo de formación de esferas, se obtuvieron cultivos de CSC de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Grimshaw et al., 2008).

Ya se ha reportado que los cultivos de CSC tienen una sobreexpresión de genes relacionados con la maquinaria de reparación del ADN, incluyendo las DSB y que exhiben radiorresistencia (López et al., 2012). Por lo que se evaluó la sensibilidad a IR induciendo DSB en el ADN de cultivos de esferas enriquecidos en CSC. Como se esperaba, observó que la DL50 de los cultivos de CSC es más alta que la DL50 de los cultivos de células tumorales en monocapa. Este resultado es congruente con los de otros trabajos anteriores, como en uno en el que las células de glioblastoma con características de troncalidad exhibieron radiorresistencia (Bao et al., 2006). De acuerdo con los resultados, los cultivos de esferas son menos sensibles a la IR que los cultivos de células tumorales de las líneas celulares HeLa y MCF-7.

Para evaluar la etapa de sensado o detección del daño en el ADN en la vía DDR, los cultivos de esferas y monocapa se expusieron a una dosis de IR cercana a su LD50, lo que afectó la supervivencia de las células en alrededor de un 50%. De manera interesante, se encontró que las proteínas clave de DDR, como pATM y γ H2A.X, tuvieron un mayor nivel de expresión en los cultivos de esferas del tratamiento con IR en comparación con la monocapa. Esto podría parecer contradictorio debido a que la fosforilación de ATM y H2A.X es consecuencia de una alteración en la continuidad de la doble cadena de ADN principalmente; entre los factores genotóxicos que pueden inducir esta fosforilación en H2A.X se encuentra el estrés (Bakkenist y Kastan, 2003; Lavin y Kozlov, 2007; Shiloh y Ziv, 2013). Las células que se emplean para los cultivos de esferas provienen de la monocapa, la cual se encuentra creciendo en un medio con SFB y al pasar al medio de esferas y condiciones no adherentes, las células son sometidas a un estrés de nutrientes pues el medio de esferas carece de SFB y esta suplementado con factores que favorecerían la proliferación de solo cierto tipo de células como las troncales. Esta expresión basal de γ H2A.X en HeLa SP permiten a las células estar listas para identificar y señalar las DSB, formando los *focis*, en cuanto estas ocurren. Como se ha reportado, numerosas moléculas de H2A.X en la cromatina que rodean cada DSB se fosforilan y sirven como una plataforma para el reclutamiento de factores encargados de la reparación de ADN y los puntos de control para la proliferación celular (Bonner et al., 2008; Fernandez-Capetillo et al., 2004).

Además, se proporciona evidencia adicional sobre el inicio de la vía DDR en cultivos enriquecidos en CSC de cáncer cervicouterino, donde ATM, γ H2A.X y PARP1 son elementos clave involucrados en la detección de daño en el ADN. Se encontró que los cultivos de esferas tienen mayor nivel de expresión de ATM y γ H2A.X después de la exposición a IR en comparación con los cultivos de líneas de células tumorales crecidas en monocapa. Se muestra que los cultivos de esferas exhiben una mayor expresión de los sensores de daño del ADN, que están activos basalmente, y esto podría explicar la alta capacidad de las CSC para la reparación del ADN. Esta nueva evidencia confirma la idea de que CSC posee una respuesta de daño de ADN eficiente lista para detectar el daño rápidamente y revela una respuesta más eficiente y una menor sensibilidad a la IR de las CSC.

HeLa SP y HeLa ML mostraron niveles altos de pATM y γ H2A.X 1 h después de la irradiación. Sin embargo, cuando se realizó la evaluación en células sin radiación, se observó la expresión basal de pATM y γ H2A.X solo en HeLa SP y su ausencia en cultivos de HeLa ML. Esto indica una respuesta eficiente en HeLa ML debido a que antes del daño no expresaba a las proteínas, pero no fue suficiente para poder sobrevivir como lo hicieron los cultivos de HeLa SP que resultaron con menor sensibilidad a la IR que los de HeLa ML. Estos hallazgos sugieren que la radiorresistencia se asocia a niveles basales elevados de las proteínas y que solo se presentan específicamente en las células que estarían en un estado de troncalidad o de indiferenciación (Bao et al., 2006; Baumann, Krause, y Hill, 2008; Kumazawa et al., 2014; López et al., 2012; Shen et al., 2014), lo que sugiere que los cultivos enriquecidos en CSC ya tienen activa la detección de las DBS en el ADN y responden con mayor eficiencia después de la IR.

La regulación del ciclo celular es una respuesta importante después del daño al ADN, inicialmente se había evaluado solo 24 horas después de la radiación, pero no se observaron diferencias entre los cultivos de monocapa y de esferas. En la búsqueda del tiempo al que las células detenían el ciclo celular para detener el daño, se encontró que desde las 9 horas posteriores a la IR, HeLa ML comenzó a detener la progresión del ciclo celular en la etapa G2/M. A las 12 horas posteriores a la IR, tanto HeLa ML como HeLa SP detuvieron el ciclo igualmente en G2/M pero 12 horas después, es decir 24 horas posteriores a la IR, ambos cultivos reestablecieron el avance del ciclo celular, pero solo los cultivos de esferas pudieron proliferar a baja densidad celular para formar nuevas esferas, mientras que los cultivos en monocapa no lo lograron; es importante recordar que HeLa SP recibió mayor dosis de IR, lo que podría indicar que pATM, quien activa el arresto del ciclo celular y transductor de la señal del daño si está desempeñando su papel ante la exposición a IR activando los puntos de control del ciclo celular y evidenciando nuevamente menos sensibilidad a la radiación por parte de los cultivos de esferas.

En el caso de PARP1, que se encarga de la poli(ADP)-ribosilación de una gran variedad de proteínas, incluyendo ella misma, los niveles de expresión entre HeLa ML y HeLa SP se mantuvieron similares. No así con la expresión de su versión cortada cPARP1, la cual carece de actividad para detectar daño en el ADN, pero con otras funciones involucradas con la apoptosis (Boulares et al., 1999). Mayor nivel de expresión

de cPARP1 en HeLa SP podría estar indicando que PARP1 está teniendo actividad continua de poli(ADP)-ribosilación y como parte de su regulación negativa es cortada para no agotar las reservas de NAD⁺ y ATP y evitar que se extienda la poli(ADP)-ribosilación. Después de la exposición a IR, cPARP1 sigue presente en HeLa SP pero ya no en HeLa ML lo que podría deberse a que la actividad de PARP1 se detuvo en HeLa ML pero no en HeLa SP.

Tanto ATM como PARP1 han sido propuestos como moléculas que podrían ser útiles para el éxito de los tratamientos contra el cáncer al ser inhibidos en sus funciones.

Reportes recientes señalan que la inhibición farmacológica de ATM puede sensibilizar por ejemplo a células de cáncer pancreático a la inmunoterapia (Zhang et al., 2019), su inhibición en iniciadoras de glioblastoma reduce su ya reconocida resistencia a la radiación (Frosina, Marubbi, Marcello, Vecchio, y Daga, 2019). En cáncer de pulmón, la inhibición de ATM decrementa el potencial metastásico de las células y mejora la respuesta a Cisplatino (M. Shen et al., 2019). ATM ya había sido propuesto como marcador de resistencia a tratamiento en cáncer cervicouterino (Roossink et al., 2012), en lo que respecta al cáncer de mama, no hay reportes donde ATM sea inhibido; sin embargo, un polimorfismo de un solo nucleótido cerca del gen ATM se ha asociado a una mejor respuesta en cáncer de mama en coadyuvancia con otros fármacos (Cuyàs et al., 2019).

Los inhibidores de PARP1 tienen mayor número de reportes en ensayos clínicos, aunque habían resultado tóxicos incluso para células no cancerosas (Gourley et al., 2019), hoy en día ya se cuenta con el fármaco Olaparib, el cual se encuentra aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) como un inhibidor específico de PARP1 (Tutt et al., 2010). Su empleo en cáncer ha tenido buenos resultados, sobre todo en cáncer de mama que es donde más se ha utilizado (Robson et al., 2017). En células HeLa se ha evaluado la regulación de PARP1 mediante su inhibición con proteínas celulares y se ha reportado al gen IER5, un gen inducido por radiación que puede inhibir a PARP1 y mejorar la respuesta a la terapia con radiación e incluso con fármacos (X. P. Yu et al., 2017). Un polimorfismo de un solo nucleótido en PARP1 ha sido asociado con una mejor inhibición de la misma, lo que podría ayudar a la personalización

de la terapia, pues aún hay pacientes que no responden a Olaparib (Abecassis et al., 2019; Cerrato, Morra, y Celetti, 2016; Hinchcliff, Westin, Dal Molin, LaFargue, y Coleman, 2019).

Se ha observado que los cultivos de esferas tienen un mayor potencial tumorigénico tanto in vitro como in vivo, además de una menor sensibilidad a DSB causadas por fármacos (Ruíz et al., 2018). La muerte de la mayoría de las células del tumor no significa necesariamente una ventaja con respecto al resultado terapéutico en la radioterapia contra el cáncer (Mirzayans, Andrais, Scott, Wang, y Murray, 2013), lo que podría ser importante para entender las posibles implicaciones en la recurrencia del tumor y en el manejo del tratamiento. A pesar del uso frecuente de quimioterapia, en la actualidad la resistencia celular al tratamiento antineoplásico es uno de los principales problemas en el control efectivo de algunos tipos de tumores. Desafortunadamente, sigue habiendo tumores para los cuales la terapia no ha logrado un gran éxito, se han vuelto resistentes y causan irremediamente la muerte de los pacientes. Por lo tanto, con estos resultados, se proporciona más evidencia para respaldar el papel de las CSC en la radiorresistencia tumoral.

10. CONCLUSIONES

En este estudio se proporciona evidencia de que las células troncales cancerosas de líneas celulares derivadas de cáncer exhiben menor sensibilidad a la radiación ionizante debido a la mayor presencia de componentes de la respuesta al daño en el ADN, específicamente a las proteínas sensoras. Además, se encontraron nuevas pruebas de que los cultivos de células troncales cancerosas aumentan la expresión de ATM, pATM, PARP1 y γ H2A.X después de la exposición a radiación ionizante. Estos resultados apoyan el rol crítico que tienen las células troncales cancerosas para determinar la respuesta del tumor a la terapia. El estudio de la vía de respuesta a daño en el ADN podría proporcionar algún blanco que pueda sensibilizar a las células troncales cancerosas a las terapias de radiación y prevenir la recurrencia del tumor.

11. PERSPECTIVAS

Para reforzar los hallazgos de este trabajo, sería necesario realizar otras evaluaciones, entre las que destacan:

- Aumentar el número de marcadores para identificar a células menos diferenciadas que las CD49f/ALDH encontradas y tal vez poder aislarlas mediante citometría.
- Verificar que las células que resultaron menos sensible a la radiación mantengan el fenotipo de CD49f positivas y con alta actividad de ALDH, que es lo que caracterizó a las células troncales cancerosas en el trabajo.
- Aumentar los puntos en la cinética de evaluación de la expresión de las proteínas pATM y γ H2A.X.
- Inhibir a las proteínas ATM, PARP1 y H2A.X para validar que su papel es esencial en la sobrevivencia celular después del daño en el ADN de células troncales cancerosas.
- Evidenciar el daño en el ADN y mostrar cómo es que se va restaurando de manera eficiente en las células troncales cancerosas mientras en el resto de las células tumorales no ocurre de la misma manera.

12. REFERENCIAS

- Abecassis, I., Sedgewick, A. J., Romkes, M., Buch, S., Nukui, T., Kapetanaki, M. G., ... Tawbi, H. (2019). PARP1 rs1805407 Increases Sensitivity to PARP1 Inhibitors in Cancer Cells Suggesting an Improved Therapeutic Strategy. *Scientific Reports*, 9(1), 3309.
- Ailles, L. E., y Weissman, I. L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current opinion in biotechnology*, 18(5), 460–466.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., y Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988.
- Alegre N. (2001). Reacción celular ante la radiación. *Radiobiología Revista electrónica*, 1, 9–11.
- Bakkenist, C. J., y Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756–760.
- Baumann, M., Krause, M., y Hill, R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Reviews Cancer*, 8(7), 545–554.
- Belkin, A. M., y Stepp, M. A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microscopy Research and Technique*, 51(3), 280–301.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P. A., y Passegue, E. (2011). DNA-Damage Response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 16–29.
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., y Pommier, Y. (2008). γ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957–967.
- Bortolomai, I., Canevari, S., y Facetti, I. (2010). Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle*, 9(6), 1194–1206.
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., y Smulson, M. (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 22932–22940.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394–424.
- Cariati, M., Naderi, A., Brown, J. P., Smalley, M. J., Pinder, S. E., Caldas, C., y Purushotham, A. D. (2008). Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *International Journal of Cancer*, 122(2), 298–304.
- Cerrato, A., Morra, F., y Celetti, A. (2016, diciembre 24). Use of poly ADP-ribose

- polymerase [PARP] inhibitors in cancer cells bearing DDR defects: The rationale for their inclusion in the clinic. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*.
- Consejo de Seguridad Nuclear. (2015). Las radiaciones. Recuperado el 29 de abril de 2019, de <https://www.csn.es/las-radiaciones>
- Corominas-Faja, B., Oliveras-Ferraros, C., Cuyàs, E., Segura-Carretero, A., Joven, J., Martín-Castillo, B., ... Menendez, J. A. (2013). Stem cell-like ALDH(bright) cellular states in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a novel mechanism of acquired resistance to erlotinib targetable with the natural polyphenol silibinin. *Cell Cycle*, 12(21), 3390–3404.
- Curtin, N. J., y Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1217–1256.
- Cuyàs, E., Buxó, M., Ferri Iglesias, M. J., Verdura, S., Pernas, S., Dorca, J., ... Menendez, J. A. (2019). The C Allele of ATM rs11212617 Associates With Higher Pathological Complete Remission Rate in Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Metformin. *Frontiers in Oncology*, 9, 193.
- Dalerba, P., Cho, R. W., y Clarke, M. F. (2007). Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annual Review of Medicine*, 58(1), 267–284.
- Darini, C., Pisani, D., Hofman, P., y Pedeutour, F. (2011). Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene*, 31, 1–12.
- Dawood, S., Austin, L., y Cristofanilli, M. (2014). Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology*, 28(12), 1101–1107, 1110.
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793–4807.
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., y Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. *Genes and Development*, 17(10), 1253–1270.
- Feldmeier, J. J. (1997). Radiación en oncología. En G. R. Weiss (Ed.), *Oncología clínica* (pp. 95–112). México: Editorial El Manual Moderno.
- Feng, D., Peng, C., Li, C., Zhou, Y., Li, M., y Ling, B. (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports*, 22, 1129–1134.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 00, 1–13.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., y Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, 3(8–9), 959–967.
- Frosina, G., Marubbi, D., Marcello, D., Vecchio, D., y Daga, A. (2019). The efficacy and toxicity of ATM inhibition in glioblastoma initiating cells-driven tumor models. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 138, 214–222
- Fukamachi, H., Seol, H. S., Shimada, S., Funasaka, C., Baba, K., Kim, J. H., ... Yuasa, Y. (2013). CD49^{high} Cells Retain Sphere-Forming and Tumor-Initiating Activities in Human Gastric Tumors. *PLoS ONE*, 8(8), e72438.

- Gaebler, M., Silvestri, A., Haybaeck, J., Reichardt, P., Lowery, C. D., Stancato, L. F., ... Regenbrecht, C. R. A. (2017). Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Frontiers in Oncology*, 7, 203.
- Gilabert, M., Launay, S., Ginestier, C., Bertucci, F., Audebert, S., Pophillat, M., ... Gonçalves, A. (2014). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) Overexpression in Human Breast Cancer Stem Cells and Resistance to Olaparib. *PLoS one*, 9(8), e104302.
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., ... Dontu, G. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–567.
- Goel, H. L., Gritsko, T., Pursell, B., Chang, C., Shultz, L. D., Greiner, D. L., ... Mercurio, A. M. (2014). Regulated Splicing of the $\alpha 6$ Integrin Cytoplasmic Domain Determines the Fate of Breast Cancer Stem Cells. *Cell Reports*, 7(3), 747–761.
- Gonçalves, A., Finetti, P., Sabatier, R., Gilabert, M., Adelaide, J., Borg, J.-P., ... Bertucci, F. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(1), 273–281.
- Gourley, C., Balmaña, J., Ledermann, J. A., Serra, V., Dent, R., Loibl, S., ... Boulton, S. J. (2019). Moving From Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition to Targeting DNA Repair and DNA Damage Response in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, JCO1802050.
- Grimshaw, M. J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J. A., Bohnenkamp, H. R., Chiapero-Stanke, L., ... Burchell, J. M. (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 10(3), R52.
- Gu, W., Yeo, E., McMillan, N., y Yu, C. (2011). Silencing oncogene expression in cervical cancer stem-like cells inhibits their cell growth and self-renewal ability. *Cancer Gene Therapy*, 18(12), 897–905.
- Harper, J. W., y Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell*, 28(5), 739–745.
- He, S., Nakada, D., y Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 377–406.
- Hinchcliff, E., Westin, S. N., Dal Molin, G., LaFargue, C. J., y Coleman, R. L. (2019). Poly-ADP-ribose polymerase inhibitor use in ovarian cancer: expanding indications and novel combination strategies. *International Journal of Gynecological Cancer*, ijgc-2019-000499.
- Hou, T., Zhang, W., Tong, C., Kazobinka, G., Huang, X., Huang, Y., y Zhang, Y. (2015). Putative stem cell markers in cervical squamous cell carcinoma are correlated with poor clinical outcome. *BMC Cancer*, 15(1), 785.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6), 673–687.
- International Agency for Research on Cancer. (2018). Cancer today, World Health Organization. Recuperado el 1 de febrero de 2019, de <http://gco.iarc.fr/>
- Ishii, H., Iwatsuki, M., Ieta, K., Ohta, D., Haraguchi, N., Mimori, K., y Mori, M. (2008).

- Cancer stem cells and chemoradiation resistance. *Cancer Science*, 99(10), 1871–1877.
- Kirsch, D. G., Diehn, M., Kesarwala, A. H., Maity, A., Morgan, M. A., Schwarz, J. K., ... Bernhard, E. J. (2018). The future of radiobiology. *Journal of the National Cancer Institute*, 110(4), 329–340.
- Krebsbach, P. H., y Villa-Diaz, L. G. (2017). The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*, 26(15), 1090–1099.
- Kumazawa, S., Kajiyama, H., Umezu, T., Mizuno, M., Suzuki, S., Yamamoto, E., ... Kikkawa, F. (2014). Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(5), 1389–1398.
- Kurz, E. U., y Lees-Miller, S. P. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*, 3(8–9), 889–900.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Christine, E., Macsworlds, J., ... Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell*, 6(5), 421–432.
- Lavin, M. F., y Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle*, 6(8), 931–942.
- Lázaro, C. A., Croager, E. J., Mitchell, C., Campbell, J. S., Yu, C., Foraker, J., ... Fausto, N. (2003). Establishment, Characterization, and Long-Term Maintenance of Cultures of Human Fetal Hepatocytes. *Hepatology*, 38(5), 1095–1106.
- Li, X., Xu, Q., Fu, X., y Luo, W. (2014). ALDH1A1 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer. *BMC cancer*, 14, 705.
- Liu, S.-Y., y Zheng, P.-S. (2013). High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget*, 4(12), 2462–2475.
- Lizano Soberón, M., y Barrera Rodríguez, R. (1993). Resistencia múltiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 45(5), 481–492.
- Lobo, N. a, Shimono, Y., Qian, D., y Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 675–699.
- López, J., Poitevin, A., Mendoza-Martínez, V., Pérez-Plasencia, C., y García-Carrancá, A. (2012). Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*, 12, 48.
- Louis, S. A., Rietze, R. L., Deleyrolle, L., Wagey, R. E., Thomas, T. E., Eaves, A. C., y Reynolds, B. A. (2008). Enumeration of Neural Stem and Progenitor Cells in the Neural Colony-Forming Cell Assay. *Stem Cells*, 26, 988–996.
- Lundholm, L., Hååg, P., Zong, D., Juntti, T., Mörk, B., Lewensohn, R., y Viktorsson, K. (2013). Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. *Cell Death and Disease*, 4, e478.
- Ma, I., y Allan, A. L. (2011). The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Review*, 7(2), 292–306.

- Maalouf, M., Granzotto, A., Devic, C., Bodgi, L., Ferlazzo, M., Peaucelle, C., ... Foray, N. (2019). Influence of Linear Energy Transfer on the Nucleo-shuttling of the ATM Protein: A Novel Biological Interpretation Relevant for Particles and Radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 103(3), 709–718.
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., y Lee, P. W. K. (2011). Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(9), 1378–1384.
- Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., y Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism y Toxicology*, 4(6), 697–720.
- Maugeri-Saccà, M., Bartucci, M., y De Maria, R. (2012). DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(8), 1627–1636.
- Maugeri-Saccà, M., Vigneri, P., y De Maria, R. (2011). Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clinical Cancer Research*, 17(15), 4942–4947.
- Mayani, H. (2013). Células troncales y medicina regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras. En R. Pelayo, J. Santa-Olalla, y I. Velasco (Eds.), *Células troncales y medicina regenerativa* (1ra ed., pp. 35–56). México: PUIS UNAM.
- Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J., y Kerbel, R. S. (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology*, 121(4), 839–852.
- Mehta, P., Novak, C., Raghavan, S., Ward, M., y Mehta, G. (2018). Self-Renewal and CSCs In Vitro Enrichment: Growth as Floating Spheres. En G. Papaccio y V. Desiderio (Eds.), *Cancer Stem Cells. Methods in Molecular Biology* (pp. 61–75). Naples, Italy: Springer.
- Minniti, G., Goldsmith, C., y Brada, M. (2012). Radiotherapy. En W. Grisold y R. Soffietti (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3rd ed., Vol. 104, pp. 215–228). Elsevier.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y. W., y Murray, D. (2013). Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. *International Journal of Molecular Science*, 14, 22409–22435.
- Mummery, C., van de Stolpe, A., Roelen, B., y Clevers, H. (2014). What Are Stem Cells? En Elsevier (Ed.), *Stem Cells, Scientific Facts and Fiction* (2a ed., pp. 54–70). China: Academic Press.
- Muschler, G. F., Midura, R. J., y Nakamoto, C. (2003). Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2003(3), 170–193.
- Nashun, B., Akiyama, T., Aoki, F., Yukawa, M., y Liu, H. (2010). Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development*, 137(22), 3785–3794.
- National Institutes of Health. (2016). Stem cell information. Recuperado el 10 de febrero de 2019, de //stemcells.nih.gov/glossary.htm
- O'Brien, C. A., Kreso, A., y Dick, J. E. (2009). Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Seminars in Radiation Oncology*, 19(2), 71–77.
- Okayasu, R. (2012). Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions-A mini

- review. *International Journal of Cancer*, 130(5), 991–1000.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Radiaciones ionizantes: efectos en la salud y medidas de protección. Recuperado el 29 de abril de 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. Recuperado el 16 de octubre de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ortiz-Sánchez, E., Santiago-López, L., Cruz-Domínguez, V. B., Toledo-Guzmán, M. E., Hernández-Cueto, D., Muñiz-Hernández, S., ... García-Carrancá, A. (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human Papilloma Virus co-receptor expression. *Oncotarget*, 7(22), 31943–31954.
- Pan, Y., y Huang, X. (2008). Epithelial ovarian cancer stem cells-a review. *International journal of clinical and experimental medicine*, 1(3), 260–266.
- Pardal, R., Clarke, M. F., Morrison, S. J., Medical, H. H., y Arbor, A. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895–902.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., y Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(5), 486–498.
- Pectasides, D., Kamposioras, K., Papaxoinis, G., y Pectasides, E. (2008). Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 34(7), 603–613.
- Pinto, D. M. S., y Flaus, A. (2010). Structure and Function of Histone H2AX. En H. Nasheuer (Ed.), *Genome Stability and Human Diseases, Subcellular Biochemistry* (Vol. 50, pp. 55–78). Springer, Dordrecht.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., ... Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*, 65(13), 5506–5511.
- Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M., y Held, K. D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncology*, 6(7), 520–528.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., y Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics y development*, 12(2), 162–169.
- Reynolds, B. A., y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707–1710.
- Richardson, A., Magrane, G., Wu, M., Carey, L., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., ... Chavarria, T. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14), 4966–4971.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., ... Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *The New England journal of medicine*, 377(17), 1700.
- Rodriguez-Fontan, F., Chahla, J., Piuze, N. S., Payne, K., Muschler, G. F., LaPrade, R. F., y Pascual-Garrido, C. (2016). Células madre y progenitoras para la reparación de cartílago articular. *Revista Latinoamericana de Cirugía Ortopédica*, 1(2), 66–76.

- Roosink, F., Wieringa, H. W., Noordhuis, M. G., Ten Hoor, K. a., Kok, M., Slagter-Menkema, L., ... Van Vugt, M. a T. M. (2012). The role of ATM and 53BP1 as predictive markers in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 131(9), 2056–2066.
- Ruíz, G., Valencia-González, H. A., León-Galicia, I., García-Villa, E., García-Carrancá, A., y Gariglio, P. (2018). Inhibition of RAD51 by siRNA and Resveratrol Sensitizes Cancer Stem Cells Derived from HeLa Cell Cultures to Apoptosis. *Stem Cell International*, 2018(ID 2493869), 11 pages.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., y Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265.
- Schiewer, M. J., y Knudsen, K. E. (2014). Transcriptional Roles of PARP1 in Cancer. *Molecular Cancer Research*, 12(8), 1069–1080.
- Schott, A. F., Landis, M. D., Dontu, G., Griffith, K. A., Layman, R. M., Krop, I., ... Chang, J. C. (2013). Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clinical Cancer Research*, 19(6), 1512–1524.
- Seufferlein, T., Ahn, J., Krndija, D., Lothar, U., Adler, G., y Wichert, G. Von. (2009). Tumor biology and cancer therapy – an evolving relationship. *Cell Communication and Signaling*, 7, 19.
- Shechter, D., Xiao, A., Chitta, R. K., Shabanowitz, J., Allis, C. D., y Hunt, D. F. (2009). A distinct H2A.X isoform is enriched in *Xenopus laevis* eggs and early embryos and is phosphorylated in the absence of a checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 749–754.
- Shen, L., Huang, X., Xie, X., Su, J., Yuan, J., y Chen, X. (2014). High Expression of SOX2 and OCT4 Indicates Radiation Resistance and an Independent Negative Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 62(7), 499–509.
- Shen, M., Xu, Z., Xu, W., Jiang, K., Zhang, F., Ding, Q., ... Chen, Y. (2019). Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 149.
- Shiloh, Y., y Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(4), 197–210.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., y Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, 63(18), 5821–5828.
- Smith, J., Smith, K., y Mézard, C. (2001). Tying up Loose Ends: Generation and Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*, 5(3), 222–235.
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., y Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, *In press*, 1–9.

- STEMCELL Technologies Inc. (2018). Identification, Evaluation and Isolation of Normal and Cancer Stem y Progenitor Cells. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <https://www.stemcell.com/products/brands/aldefluor-aldh-assay.html>
- Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A., y Kruuv, J. (1970). A Multi-component Radiation Survival Curve Using an in Vitro Tumour Model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 18(5), 491–495.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., ... Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(12), 4234–4241.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., ... Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*, 27(1), 13–24.
- Toda, S., Matsunobu, A., Aoki, S., Ootani, A., Yamamoto, M., Yamasaki, F., ... Sugihara, H. (2011). Culture Models for Studying Thyroid Biology and Disorders. *ISRN Endocrinology*, 2011, 1–9.
- Toledo-Guzmán, M. E., Ibañez-Hernández, M., Gómez-Gallegos, Á. A., y Ortiz-Sánchez, E. (2019). ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Current Stem Cell Research y Therapy*, 14(5), 375–388.
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S. M., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., ... Carmichael, J. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: A proof-of-concept trial. *The Lancet*, 376(9737), 235–244.
- Vaish, M. (2007). Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Molecular cancer*, 6(1), 26.
- Vassalli, G. (2019). Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells International*, 2019, 1–15.
- Von Minckwitz, G., Müller, B. M., Loibl, S., Budczies, J., Hanusch, C., Darb-Esfahani, S., ... Denkert, C. (2011). Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 29(16), 2150–2157.
- Wang, H., Paczulla, A. M., Konantz, M., y Lengerke, C. (2018). In Vitro Tumorigenic: The Tumor Spheres Assay. En G. Papaccio y V. Desiderio (Eds.), *Cancer Stem Cells. Methods in Molecular Biology* (pp. 77–87). Naples, Italy: Springer.
- Wang, X., Ongkeko, W., Chen, L., y Yang, Z. (2010). Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4–AKT–ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology*, 52(2), 528–539.
- Weiswald, L. B., Bellet, D., y Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, 17(1), 1–15.
- Xie, Q., Liang, J., Rao, Q., Xie, X., Li, R., Liu, Y., ... Lin, Z. (2016). Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression Predicts Chemoresistance and Poor Clinical Outcomes in Patients with Locally Advanced Cervical Cancer Treated with





- Noadjuvant Chemotherapy Prior to Radical Hysterectomy. *Annals of Surgical Oncology*, 23(1), 163–170.
- Yoon, S. O., Shin, S., y Lipscomb, E. A. (2006). A novel mechanism for integrin-mediated Ras activation in breast carcinoma cells: The $\alpha 6\beta 4$ integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling. *Cancer Research*, 66(5), 2732–2739.
- Yoshida, G. J., y Saya, H. (2016). Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Science*, 107(1), 5–11.
- Yu, K. R., Yang, S. R., Jung, J. W., Kim, H., Ko, K., Han, D. W., ... Kang, K. S. (2012). CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells*, 30(5), 876–887.
- Yu, X. P., Wu, Y. M., Liu, Y., Tian, M., Wang, J. D., Ding, K. K., ... Zhou, P. K. (2017). IER5 is involved in DNA double-strand breaks repair in association with PAPR1 in hela cells. *International Journal of Medical Sciences*, 14(12), 1292–1300.
- Zhang, Q., Green, M. D., Lang, X., Lazarus, J., Parsels, J., Wei, S., ... Morgan, M. A. (2019). Inhibition of ATM increases interferon signaling and sensitizes pancreatic cancer to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Research*, canres.0761.2019.
- Zhou, B.-B. S., y Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408, 433–439.
- Zhou, Z., Qu, J., He, L., Peng, H., Chen, P., y Zhou, Y. (2018). $\alpha 6$ -Integrin alternative splicing: Distinct cytoplasmic variants in stem cell fate specification and niche interaction. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 122.

13. ANEXO. ARTÍCULO ORIGINAL

Hindawi
Stem Cells International
Volume 2019, Article ID 7038953, 10 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/7038953>

*Research Article*

Cancer Stem Cells from Tumor Cell Lines Activate the DNA Damage Response Pathway after Ionizing Radiation More Efficiently Than Noncancer Stem Cells

Heriberto Abraham Valencia-González ^{1,2}, Graciela Ruíz ², Elizabeth Ortiz-Sánchez ², and Alejandro García-Carrancá ²

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, Mexico

²Laboratorio de Virus y Cáncer, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México & Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Alejandro García-Carrancá; carranca@biomedicas.unam.mx

Received 26 July 2018; Revised 29 November 2018; Accepted 24 December 2018; Published 3 April 2019

Academic Editor: Christian Morsczeck

Copyright © 2019 Heriberto Abraham Valencia-González et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Recently, a subpopulation of tumor cells, called cancer stem cells (CSC), has been characterized, and these have emerged as a major topic in cancer research. CSC are proposed to repair DNA damage more efficiently than the rest of tumor cells, resisting chemotherapy or radiotherapy and causing clinical recurrence and metastasis. We aimed to determine the molecular basis of radioresistance and first compared the response to ionizing radiation (IR) between cancer stem cell-enriched cultures grown as spheres and conventional tumor cell line cultures grown as monolayer, from HeLa and MCF-7 cancer cell lines. To verify that our sphere cultures were enriched in CSC, we evaluated the double staining of CD49f and ALDH activity for HeLa cells by flow cytometry. We then evaluated whether differences could exist in sensor elements in the DNA damage response pathway among these cultures. We found that CSC cultures showed less sensitivity to radiation than conventional tumor cell line cultures. We observed a higher baseline expression of activated response sensor proteins of DNA damage, such as ATM, H2A.X, and PARP1, in untreated CSC cultures. These findings provide the first evidence, to our knowledge, that DNA damage response sensor proteins are present and preferentially activated in CSC, as opposed to the bulk of cells in monolayer cultures. Likewise, they provide the basis for biological differences in response to IR between CSC and other tumor cell populations. Understanding the DNA damage response pathway may provide therapeutic targets to sensitize CSC to cytotoxic therapies to improve current cancer treatments.

1. Introduction

Cancer is a disease of genetic and epigenetic alterations, which is highlighted as the central mechanisms of tumor progression in the multistep carcinogenesis model. Despite advances in surgical capabilities and chemotherapy strategies, a substantial proportion of patients continue to die from recurrent or chemotherapy-resistant disease. Such are the cases of cervical and breast cancers, where approximately 35% of women diagnosed with cervical cancer have recurrent disease, and 90% of these occur within 3 years of initial

treatment [1], and women with breast cancer who are not diagnosed or treated early have a higher risk of dying from this disease [2].

Increasing evidence has suggested the existence of a subset of cells, called cancer stem cells (CSC) or cancer-initiating cells, which are distinct from the bulk of tumor cells and which are responsible for the long-term maintenance of tumor growth in several cancers. CSC can self-renew, drive tumorigenesis, are naturally resistant to chemotherapeutic agents, and might be responsible for tumor recurrence after therapy.

For studying and the obtaining of CSC cultures, the sphere-forming assay has been used, which serves as functional assay reported for enrichment in undifferentiated cells with enhanced tumor initiation ability from cancer cell lines [3, 4] and which has been used successfully to isolate and characterize CSC from several cancers such as brain [5], lung [6, 7], and breast [8–11].

To identify these CSC populations, CD49f and ALDH activity has been employed as markers. CD49f is an integrin $\alpha 6$ transmembrane protein that has been identified in germinal cells from embryonic stages to somatic cells in adult organisms [12]. CD49f works as laminin receptor and activates key signaling pathways for the invasion and migration of carcinoma cells [13, 14]. Also, high expression of CD49f has been associated with poor prognosis in cervical cancer patients [15]. On the other hand, ALDH is a polymorphic enzyme involved in the oxidation of aldehydes into carboxylic acids and may have a role in the early differentiation of stem cells, oxidizing retinol into retinoic acid [16]. ALDH was recognized as a marker of CSC, has been associated with chemoresistance in breast cancer [16, 17], and has been reported as enhancing the self-renewal and differentiation potentials in cervical cancer stem cells [16, 18, 19].

The mechanisms of CSC resistance to therapy include, among other aspects, an overexpression of DNA repair proteins [20–22]. The most harmful and most intensely studied lesions in DNA are double-strand breaks (DSB), which are caused by ionizing radiation (IR) during radiotherapy. The cellular response to DSB, known as the DNA damage response pathway, is developed through a series of steps involving sensor, transducer, and effector proteins [23, 24]. DSB are first detected by sensors as Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), which might recognize the DNA lesion itself or the chromatin alterations caused by DSB. Then, transducers such as H2A.X and PARP1 are recruited to the damage site, which serve to assemble the DSB repair complex at the site-of-damage and that activate downstream signaling to convey the DSB signal to the effectors. ATM is a kinase protein, a member of the phosphatidylinositol 3-kinase-related family of protein kinases. ATM transmits the message via various means, including phosphorylation of proteins such as the histone variant H2A.X, p53, and checkpoint kinase 2 [25]. PARP1 is a chromatin-associated protein that participates in various biological functions such as cell proliferation and apoptosis, as well as DNA repair. In damaged DNA, PARP1 is activated and catalyzes the polyADPribosylation of diverse nuclear proteins, including elements of DNA repair pathways [26]. Some reports show an adverse prognosis in breast cancer regarding the overexpression of PARP1 [27, 28].

CSC are proposed to repair DNA damage more efficiently than other tumor cells, resisting the therapies and causing clinical recurrence and metastasis after therapy. Our aim was to determine the differences that exist in elements in the DNA damage response after exposure to IR between cancer stem cell-enriched (CSC) cultures growing as spheres and conventional tumor cell lines growing as monolayer. Our findings provide the first evidence, to our

knowledge, that response sensor proteins of DNA damage are present and activated preferentially in CSC cultures, as opposed to the bulk of cells in conventional cultures, and that they provide the basis for the biological differences in the response to IR between CSC and other tumor cell populations.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures. The human cervical cancer cell line HeLa (authenticated by STR DNA profiling at University of Colorado DNA Sequencing and Analysis Core according to the report number DP0297 issued by the university) was maintained and grown as monolayer (HeLa ML) using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®), and the human breast cancer cell line MCF-7 (ATCC) was maintained and grown as monolayer (MCF-7 ML) using DMEM F-12 (Gibco®), with both culture media containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®), the antibiotics penicillin and streptomycin (Gibco®), and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The sphere-forming assay of cell lines was performed using MammoCult™ medium (Stem Cell Technologies) with serum replacement, hydrocortisone, heparin, and antibiotics according to supplier's instructions (Stem Cell Technologies). The sphere cultures were obtained with 3,000 cells/mL of HeLa (HeLa SP) or MCF-7 (MCF-7 SP) cell lines, which was seeded onto a 100 mm ultra-low attachment culture dish (Corning) using 7 mL of MammoCult™ medium. Then, this was incubated for 4 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. SP cultures were used on day 4 of growth for the assays, and ML cultures were used at 80% of confluence. The SP cultures are the cancer stem cell-enriched cultures and the ML cultures are the conventional tumor cell line cultures.

2.2. Protein Extraction and Western Blot. Total protein of cultures was obtained with lysis buffer (50 mM Tris Base, 5 mM EDTA, 133 mM NaCl, 1 mM PMSF, and 1% Triton X-100). Quantification was performed using the Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). The already extracted proteins were preserved at -70°C. 50 µg of protein was separated using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. Then, these were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in 0.05% phosphate-buffered saline solution-tween 20 (PBST) for 1 h at room temperature, followed by incubation with primary antibody against ATM (Abcam, ab78), pATM (Abcam, ab36810), PARP1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8007), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-48167), and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) at 4°C overnight. Subsequently, the membranes were incubated with secondary antibody goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) or donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020) diluted in 5% BSA for 1 h at room temperature and washed with PBST. Immunodetection was performed using Immobilon™ Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, WBKLS0500) and visualized with C-DiGit equipment

(Li-Cor). Data were presented as relative expression protein levels normalized for β -actin or GAPDH protein.

2.3. Ionizing Radiation. ML and SP cell cultures were harvested and resuspended in DMEM and in Mammocult medium, respectively. Cultures were irradiated at doses of 0–10 Gy using a self-contained Gammacell 1000 Elite Nordion Cesium 137 Irradiator with an emission rate of 4.056 Gy/min (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). The cultures were maintained on ice prior to irradiation; immediately after irradiation, cells were returned to the incubator for recovery until the appropriate time point. To perform the assay, the cultures were exposed to a dose of IR that affected the survival fraction at around 0.5, for HeLa ML was 1.5 Gy and for HeLa SP was 6.0 Gy.

2.4. Flow Cytometry. Cancer stem cell markers: HeLa ML and HeLa SP cultures were suspended in flow buffer (0.05% BSA, 2 mM EDTA in PBS). For CD49f protein, the cell suspension was stained with anti-CD49f-PE (BD Biosciences, 555736) for 30 min, then washed and maintained with cold flow buffer until reading. For the ALDH assay, the Aldefluor™ kit (Stem Cell Technologies, 01700) was performed according to supplier's instructions. For the double staining with CD49f and ALDH activity, the first staining was performed with the ALDH assay followed by staining with anti-CD49f-PE which maintained these cold and protected from light until reading. The reading of the samples was done with the Beckman Coulter Cytometer (UIMEO-IMSS, México); the CD49f-positive cells were visualized by the phycoerythrin channel (FL-2), and the ALDH activity-positive cells were visualized by the fluorescein isothiocyanate channel (FL-1). The data were analyzed with FlowJo® software.

2.5. Cell Cycle Analysis. After IR treatment, cell cultures were incubated for 0–24 h, fixed with 2% paraformaldehyde for 5 min, washed with PBS, and permeabilized with methanol at -20°C. The cells were suspended in staining buffer (5 μ g/mL propidium iodide (Sigma, P4170), 10 μ g/mL RNase A (Invitrogen, 12091-02), 0.5% Triton X-100 (USB, 22686), and PBS) for 40 min, read on an Attune AV Flow Cytometer (BD, LabNalCit IIB-UNAM), and analyzed with FlowJo® software.

2.6. Clonogenic Assay. After treatment with doses of 0–10 Gy IR, 500 single cells/well of ML cultures were seeded on 6-well microplates (Corning), three wells per condition; on day 14, the colonies formed were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet. For SP cultures, 100 single cells/well were seeded on 96-well ultra-low attachment microplates (Corning), 12 wells per condition; on day 7, only the spheres formed were counted. Colonies or spheres larger than 70 μ m were qualified as deriving from a single cloning cell. Plating efficiency (PE) and survival fraction (SF) after the dose were calculated using equations (1) and (2). The clonogenic assay for ML cultures was read on day 14 to render the growth of colonies more evident; the SP cultures were read at day 7 because, after this time, indistinguishable agglomerates are formed.

The median lethal dose (LD50) was obtained employing an exponential mathematical model.

$$PE = \frac{\text{Number of colonies or spheres by control}}{\text{Number of seeded cells}}, \quad (1)$$

$$SF = \frac{\text{Number of colonies or spheres formed after treatment}}{(\text{Number of seeded cells})(PE)}. \quad (2)$$

2.7. Immunofluorescence. After the IR treatment, the cell cultures were incubated at 0.5 and for 1 h in their respective media at 37°C, with 5% CO₂. After incubation, the cultures were harvested, fixed with 2% paraformaldehyde for 5 min, and suspended in PBS. Individual cells were attached to the slide by centrifugation with CytoSpin Rotofix 32A (Hettich). The cells on the slide were immunostained with the γ H2A.X (Abcam, ab81299) and pATM (Abcam, ab36810) antibodies. In brief, cells were blocked with blocking solution (5% SFB, 0.6% Triton X-100, PBS) for 1 h, washed with PBS, incubated with the antibodies overnight at 4°C, washed with PBS, incubated with secondary fluorescent antibody goat anti-rabbit IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-2012) or goat anti-mouse IgG-Fluorescein (Santa Cruz Biotechnology, sc-2010) for 2 h, washed with PBS, and mounted using Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, H-1200). The images were acquired with an Olympus IX71 inverted microscope or a Nikon A1R+STORM confocal microscope (Unidad de Microscopía at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). The images were analyzed with ImageJ and NIS-Elements Viewer software.

2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using a two-tailed Student *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey test by GraphPad Prism statistical software (ver. 5.0). *P* values < 0.01 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Obtaining Cancer Stem Cell-Enriched Cultures as Spheres. With the sphere-forming assay, we obtained the sphere cultures grown under the nonadherent conditions that we have previously used this method to obtain cancer stem cell-enriched (CSC) cultures from tumor cell lines grown as monolayer, which were considered conventional tumor cell cultures. Employing this strategy, we obtained CSC cultures of the HeLa cell line grown as spheres (HeLa SP). We found that 87% of the cells of HeLa SP cultures were CD49f-positive, while 80% of the cells of HeLa grown as monolayer (HeLa ML) were CD49f-negative (Figure 1). The expression of both CD49f and ALDH activity was present in 11% of the population grown as spheres, while only 0.64% of the population grown as monolayer were positive. Also, we performed a sphere-forming assay to obtain CSC cultures from the MCF-7 breast cancer cell line. In this case, the growth by formation of spheres is sufficient to obtain CSC cultures.

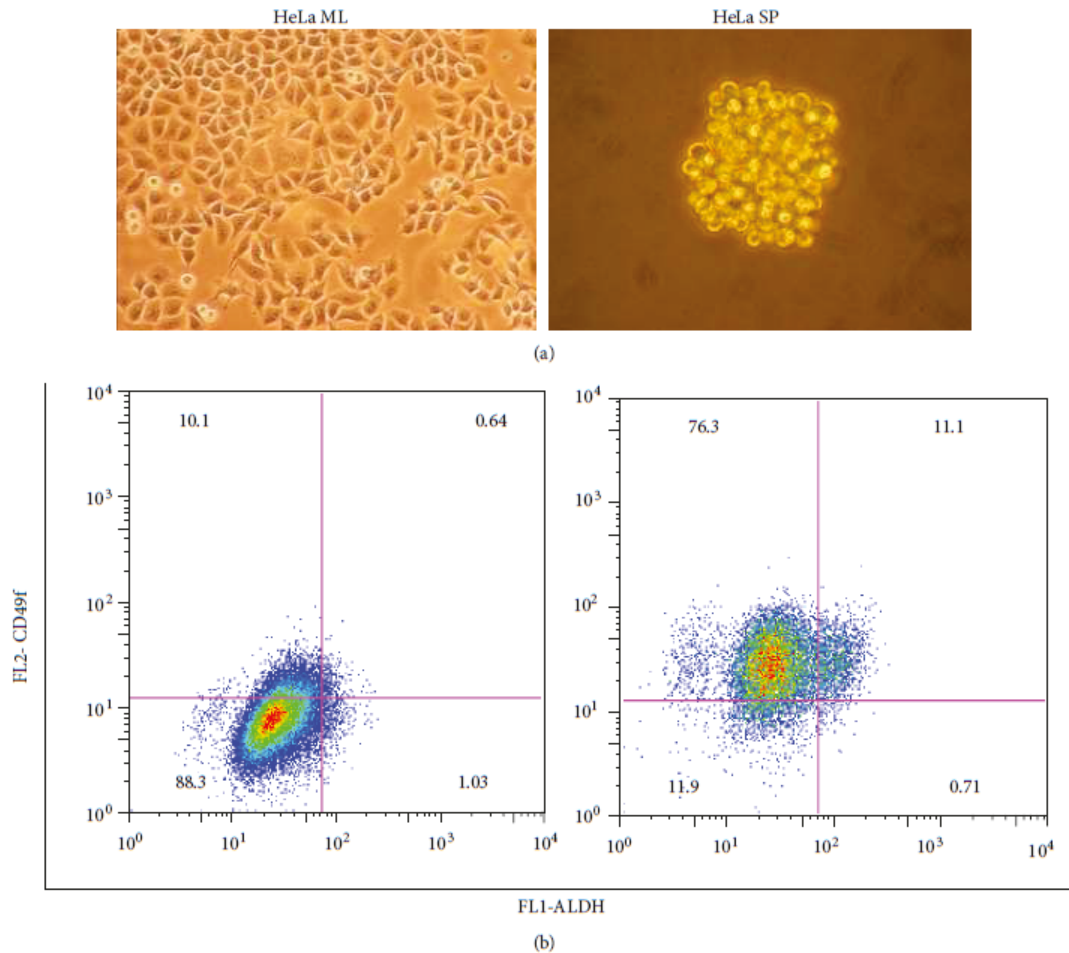


FIGURE 1: HeLa SP are positive for cancer stem cell markers. (a) Microscopy of cultures derived from the HeLa cell line growing as monolayer (HeLa ML) and as spheres (HeLa SP), objectives 20x and 40x, respectively. (b) Flow cytometry analysis of HeLa ML and HeLa SP cultures for CD49f and high ALDH activity, with the gates representing the percentage of cell populations positive for staining. For HeLa SP, 87% of cells were positive for CD49f, nearly 12% were positive for high ALDH activity, and for both markers, 11% were positive. In HeLa ML, 88% of cells were negative for both markers, while less than 1% were positive for the latter.

3.2. Cancer Stem Cells Display Less Sensitivity to Ionizing Radiation. The determination of the sensitivity of ionizing radiation (IR) demonstrated that sphere cultures were less sensitive to radiation than the monolayer cultures of HeLa and MCF-7 cell lines. As expected, both growth conditions of the cell lines revealed a progressive decrease in survival with an increasing dose of IR, but CSC cultures exhibited less sensitivity to IR. ML cultures did not survive after having been exposed to doses greater than 5 Gy, while SP cultures survived up to the 6 Gy dose (Figure 2(a)). Through an exponential mathematical model, it was possible to obtain the median lethal dose (LD50) of each culture; for HeLa ML this was 1.6 Gy, for HeLa SP this was 4.2 Gy (Figure 2(b)), for MCF-7 ML this was 1.3 Gy, and for MCF-7 SP, this was 4.0 Gy (Figure 2(c)). The LD50 of the CSC cultures was higher than the LD50 of conventional tumor cell line cultures. The plating efficiency (PE) of HeLa ML was 47.2%

and 39.0% for HeLa SP, while the PE of MCF-ML was 90% and 10% for MCF-7 SP.

We report the clonogenic assay at days 7 and 14 of growth after radiation for SP and ML cultures, respectively. However, the number of colonies formed on day 7 by ML cultures did not change on day 14. Growth up to day 14 evidenced the size of the colonies.

3.3. Progression of the Cell Cycle Showed No Differences among Cultures after Ionizing Radiation. We examined possible changes in the cell cycle of HeLa SP and ML cultures up to 24 h after radiation. Both ML and SP cultures stopped the cell cycle in the G2/M phase 12 h after exposure to the IR dose; we observed an accumulation of 64% of the cell population in HeLa ML and of 83% in HeLa SP (Figure S1). It is very important to highlight that cancer stem cell-enriched cultures, after having stopped their cell cycle, continued to

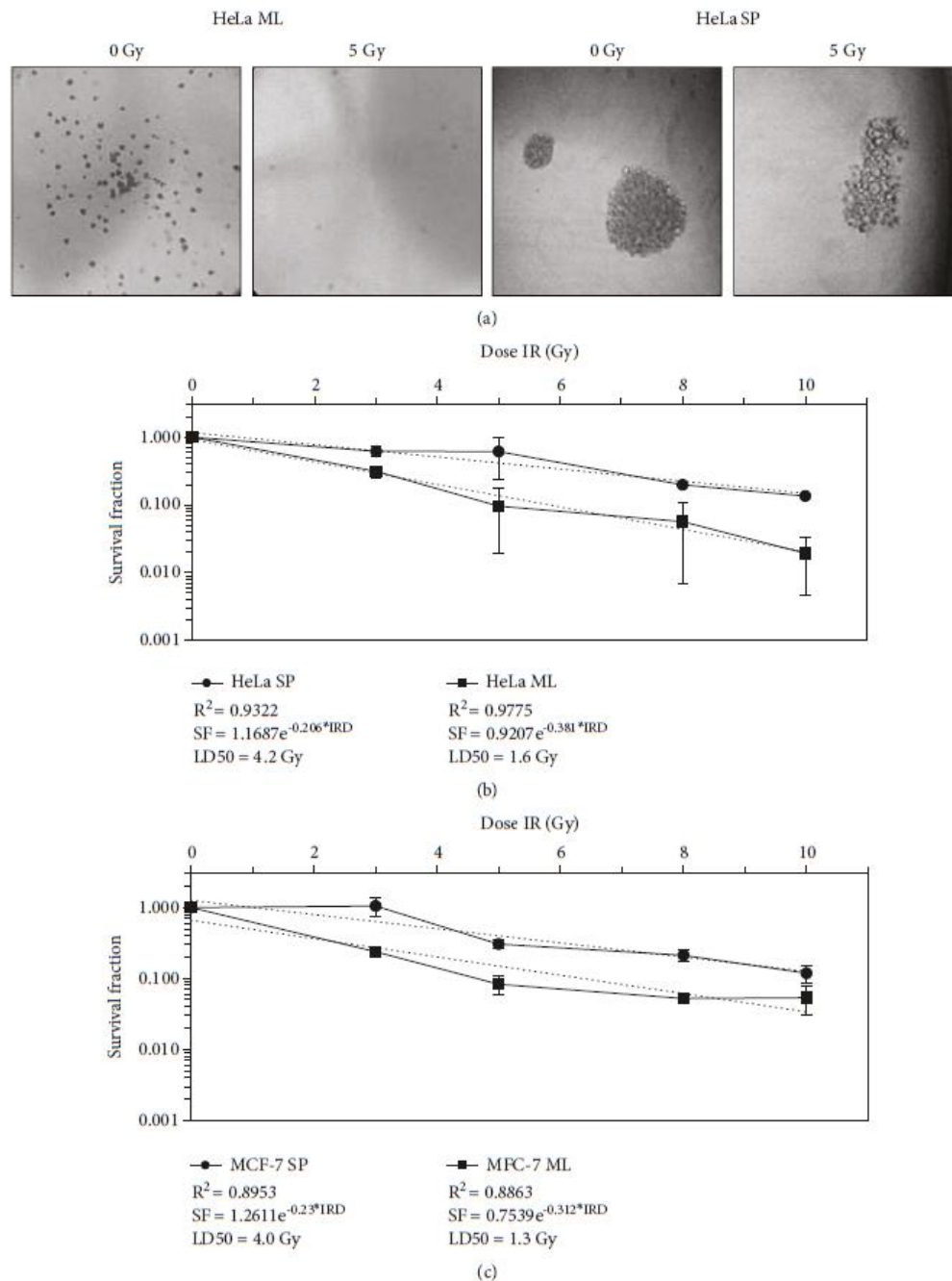


FIGURE 2: Sphere cultures from HeLa and MCF-7 cells are less sensitive to ionizing radiation. (a) Clonogenic assay indicated that up to a 5 Gy IR dose, HeLa ML died while HeLa SP continued to proliferate. Objective 4x and 40x, respectively. (b) Survival data after ionizing radiation doses showed that HeLa SP and (c) MCF7 SP have a higher survival fraction (SF) than HeLa ML and MCF-7 ML cultures. The median lethal dose (LD50) was calculated using an exponential mathematical model; for HeLa ML, this was 1.6 Gy, for HeLa SP, this was 4.2 Gy, for MCF-7 ML, this was 1.3 Gy, and for MCF-7 SP, this was 4.0 Gy. Data shown are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of two independent experiments. IRD: ionizing radiation dose.

proliferate. Notwithstanding that ML cultures restored the cell cycle, they could not continue to proliferate later in time, in agreement with the clonogenic assay.

3.4. Activation of ATM and PARP1 Is More Efficient in Cancer Stem Cells after Ionizing Radiation. We evaluated the expression of ATM and PARP1 in HeLa SP cultures

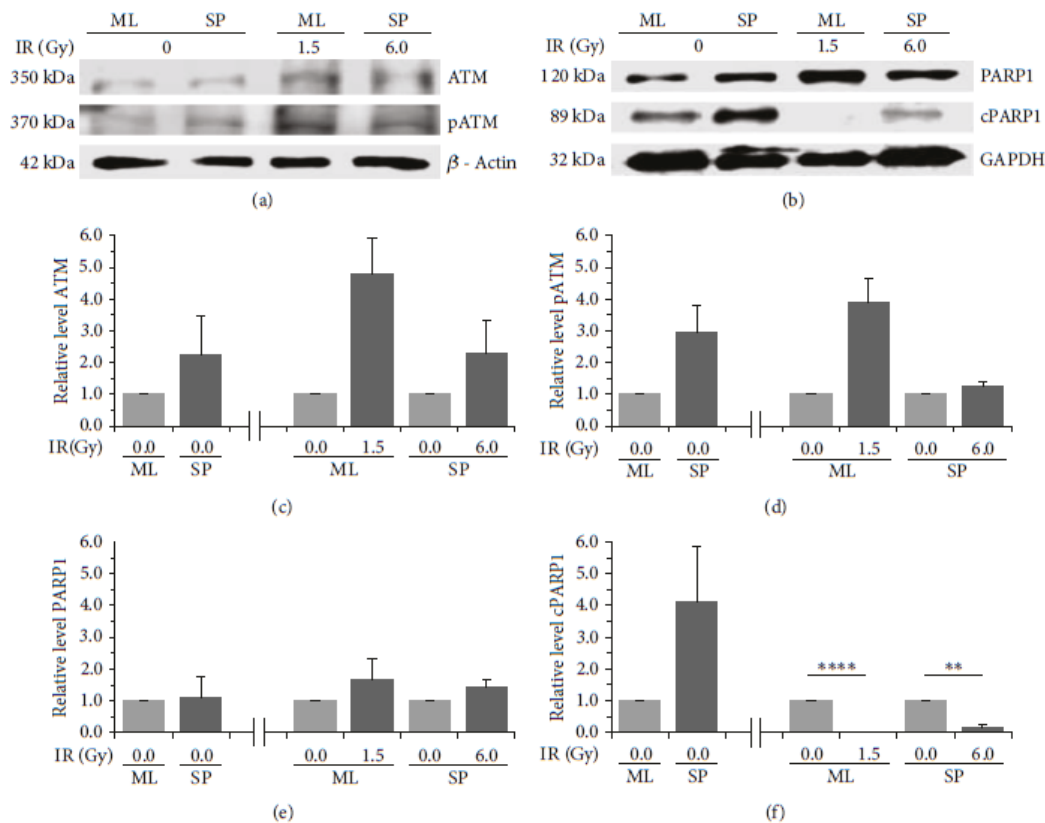


FIGURE 3: ATM and PARP1 are present and activated in cancer stem cells before and after ionizing radiation. (a) Representative immunoblot showing overall expression of ATM and phospho ATM (pATM) in SP and ML cultures before and 3 h after exposure to ionizing radiation (IR). (b) Representative immunoblot showing overall expression of PARP1 and cleaved PARP1 (cPARP1) in HeLa SP and HeLa ML cultures before and 3 h after exposure to IR. (c) HeLa SP cultures had a higher level of ATM protein than HeLa ML cultures without exposure to IR. After exposure to IR, ATM expression increased in both cultures. (d) HeLa SP cultures had a higher level of pATM than HeLa ML cultures without exposure to IR. After exposure to IR, only HeLa ML cultures had an increase of pATM. (e) HeLa SP and HeLa ML cultures exhibited no differences in the level of PARP1 protein before and after exposure to IR. (f) HeLa SP cultures had a higher level of cPARP1 than HeLa ML before exposure to IR. After exposure to IR, both cultures had a decreased level of cPARP1; however, HeLa SP continued to express cPARP1. β -Actin and GAPDH were used as loading control. The relative level of these proteins to β -Actin and GAPDH was analyzed by densitometry. The normalized level of proteins was expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) at least two independent experiments.

without IR and compared these with HeLa ML cultures without IR. We found that HeLa SP cultures had a higher level than HeLa ML cultures of ATM and of phospho ATM (pATM), the latter the activated form of ATM. When HeLa ML cultures were exposed to a 1.5 Gy IR dose, the ATM and pATM proteins increased between 2- and 3-fold (Figures 3(a), 3(c), and 3(d)). On the other hand, HeLa SP and HeLa ML cultures without an IR dose did not exhibit differences in the level of the PARP1 protein, while HeLa SP and HeLa ML demonstrated the same level. However, the level of cleaved PARP1 protein (cPARP1) was 3-fold higher in HeLa SP. When HeLa ML and HeLa SP were exposed to the previously mentioned IR dose, the level of PARP1 protein continued for 3 h without change between treated and untreated cultures; in the opposite manner, the level of cPARP1 protein was different between treated and untreated cultures. HeLa SP

continued to have more cPARP1 protein than HeLa ML after exposure to their IR dose (Figures 3(b), 3(e), and 3(f)). It is important to highlight that sphere cultures at a dose of 6 Gy of IR respond in a similar way to that of monolayer cultures at a 1.5 Gy IR dose.

3.5. Cancer Stem Cells Possess an Active DNA Damage Response Pathway. The presence of phosphorylated H2A.X (γ H2A.X) and phosphorylated ATM (pATM) protein in HeLa ML and HeLa SP was detected by immunofluorescence. Interestingly, HeLa SP has a baseline expression of these proteins compared with HeLa ML without exposure to radiation (Figure 4(a)). Also, the presence of γ H2A.X increased with IR treatment in both types of cultures. With a 1.5 Gy dose of IR, both cultures increased the presence of γ H2A.X and pATM 1 h after radiation. Following the kinetic of expression for up to 1 h, both γ H2A.X and pATM were higher

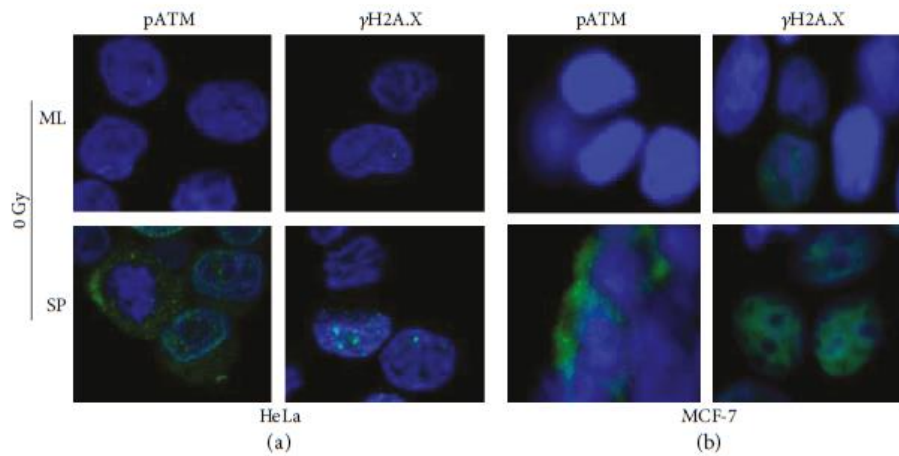


FIGURE 4: Cancer stem cells have baseline expression of pATM and γ H2A.X. Immunofluorescence staining for pATM and γ H2A.X protein (green). Visualization of nuclei by DAPI (blue). (a) HeLa SP cultures expressed pATM and γ H2A.X in baseline levels. (b) MCF-7 SP cultures expressed pATM and γ H2A.X in baseline levels. The representative images of the microscopy analysis indicate that pATM and γ H2A.X proteins are expressed in baseline levels in CSC cultures. Objective 60x.

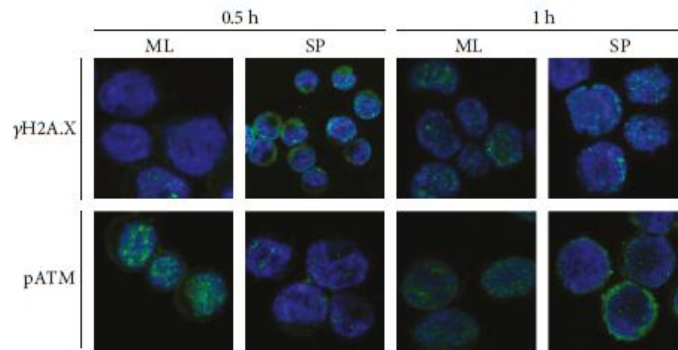


FIGURE 5: HeLa SP overexpress pATM and γ H2A.X after ionizing radiation. Localization of pATM and γ H2A.X expression after 0.5 h and 1 h exposure to ionizing radiation in HeLa SP and HeLa ML using anti-pATM antibody (green) and anti- γ H2A.X antibody (green). Visualization of nuclei by DAPI (blue). The representative images of the microscopy analysis indicated that γ H2A.X is activated always in SP cultures, while in ML cultures, the activation of γ H2A.X began 1 h after exposure to 1.5 Gy IR dose. Objective 60x.

after irradiation in HeLa SP and HeLa ML cultures. However, prior to IR treatment, the level of pATM protein did not appear in monolayer cultures, while in sphere cultures, this was expressed in the baseline condition and increased with radiation (Figure 5). The signal of γ H2A.X was strong in HeLa SP after radiation, but this was lower at 0.5 h after radiation in HeLa ML, while increasing 1 h later. pATM was identified in HeLa SP and HeLa ML cultures under the same conditions as γ H2A.X. A time-course immunofluorescence for pATM demonstrated a strong induction after IR at 0.5 h and 1 h. As expected, pATM and γ H2A.X were identified mainly in MCF-7 SP cultures without exposure to IR, as in HeLa cells (Figure 4(b)).

4. Discussion

Cancer stem cells, responsible for resistance to therapy and tumor recurrence in several types of cancer, are being

intensively studied to identify the molecular and cellular bases of events that block the complete elimination of tumors. According to different reports, a strategy used to obtain cancer stem cell-enriched (CSC) cultures comprises the sphere-forming assay. In order to characterize these populations, cervical cancer stem cell markers, such as CD49f and ALDH activity, have been reported [29–35]. Thus, in our work, we performed this method to obtain CSC cultures from a cervical cancer cell line and we performed, to our knowledge for the first time, double staining for CD49f protein and high ALDH enzyme activity in order to characterize these. Likewise, with the sphere-forming assay, we obtained CSC cultures from the MCF-7 breast cancer cell line [3]. With our results, we confirmed that our sphere culture model is composed of cells with a specific phenotype and enzymatic activity different from that of conventional tumor cell cultures (CD49 and high ALDH activity).

Recently, it has been reported that CSC cultures have an overexpression of genes involved in their DNA repair machinery for the double-strand break (DSB) and to exhibit radioresistance [34]. Therefore, we evaluated the sensitivity to ionizing radiation (IR) by inducing DNA DSB in CSC cultures. As expected, we observed that the LD50 of CSC cultures is higher than the LD50 of conventional tumor cell cultures. This result is congruent with those of other previous works, such as in one in which glioblastoma cells with stemness characteristics exhibited radioresistance [36]. According to our results, sphere cultures are less sensitive to IR than conventional tumor cell cultures from HeLa and MCF-7 cell lines.

To identify the stage of DNA damage sensing in the DNA damage response (DDR) pathway, SP and ML cultures were exposed at an IR dose near to that of their LD50, which affected cell survival by around 50%. Interestingly, we found that key proteins of DDR, such as pATM and γ H2A.X, had a higher expression prior to IR treatment compared with monolayer. This is curious because the phosphorylation of ATM and H2A.X entails the consequence of an alteration in the continuity of the DNA strand [37–39]. The expression of γ H2A.X under baseline conditions in HeLa SP could be explained by means of previous works reporting that numerous H2A.X molecules in the chromatin surrounding each DSB are phosphorylated within minutes after irradiation; these are known as “ γ H2A.X foci.” These γ H2A.X foci are thought to serve as a platform for the recruitment of DNA repair and checkpoint signaling factors [40, 41].

In addition to this, we provide additional evidence concerning the beginning of the DDR pathway in CSC from cervical cancer, where ATM, H2A.X, and PARP1 are key elements involved in the detection of DNA damage. We found that CSC cultures overexpress these proteins after IR compared with conventional tumor cell line cultures. Interestingly, we show here, to our knowledge for the first time, that CSC cultures exhibit an elevated expression of DNA damage sensors, which are active basally, and this could explain the high capacity of CSC for DNA repair. This new evidence confirms the idea that CSC possess an efficient DNA damage response ready to detect DNA damage quickly and reveals a more efficient response and a lower sensitivity to IR of cancer stem cells.

HeLa SP and HeLa ML exhibited high levels of pATM and γ H2A.X 1 h after irradiation. However, when we performed the evaluation on cells without radiation, we observed the baseline expression of pATM and γ H2A.X only in HeLa SP and their absence in HeLa ML cultures. This indicates a more efficient response and a lower sensitivity to the IR of the cancer stem cells than conventional tumor cell line cultures. These findings suggest that radioresistance is specifically associated with the stemness state [34, 36, 42–44] suggesting that cancer stem cell-enriched cultures are more efficient in detecting DNA damage due to IR. Cell cycle regulation is an important response after DNA damage, and previously, this evaluation had been carried out 24 h after radiation, but no differences were observed between monolayer and sphere cultures. Both cultures restore the cell cycle, but only CSC remained clonogenic,

even after a higher IR dose. This confirms that pATM is a sensor of damage in CSC and that it plays a central role in the cellular response to IR, activating cell cycle checkpoints that lead to DNA damage-induced arrest in DNA repair.

We have observed that these cultures have a greater tumorigenic potential both *in vitro* and *in vivo*, also demonstrating greater resistance to DSB caused by a drug [45]. Cell death does not necessarily mean an advantage regarding the therapeutic result in radiation therapy against cancer [46]. This could be important in terms of understanding the possible implications in tumor recurrence and in managing the treatment. Despite the frequent use of chemotherapy, at present, cellular resistance to antineoplastic treatment is one of the main problems in the effective control of some types of tumors. Unfortunately, there continue to be tumors for which chemotherapy has not achieved great success: tumors with a good response to treatment commonly become resistant to drugs, irretrievably causing the death of patients. Therefore, with our results, we provide more evidence to support the role of CSC in radioresistance to cervical cancer.

5. Conclusions

Our study provides, to our knowledge, the first evidence that cancer stem cells from cancer-derived cell lines exhibit radioresistance due to the increased presence of components from the DNA damage response, specifically sensor proteins. We additionally found new evidence that CSC cultures had increased the expression of ATM, pATM, PARP1, and γ H2A.X after radiation treatment. These results support critical roles for cancer stem cells in determining tumor response to therapy. The study of the DNA damage response pathways may provide therapeutic targets to sensitize cancer stem cells to radiation therapies and to prevent tumor recurrence. Our findings may be of great value for the development of therapies using as targets DNA damage response proteins.

Abbreviations

CSC:	Cancer stem cells
ML:	Monolayer
SP:	Spheres
DSB:	Double-strand break
IR:	Ionizing radiation
DNA:	Deoxyribonucleic acid
LD50:	Median lethal dose
DDR:	DNA damage response.

Data Availability

The data (all the results) used to support the findings of this study are included within the article.

Disclosure

Graciela Ruiz's present address is Division of Viral Transformation Mechanisms, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

Heriberto Abraham Valencia-González and Graciela Ruíz contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT no. 253804 to AG-C) and Fundación Miguel Alemán, A.C. (to AG-C). The Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud (SS) provided funding and Open Access publication charges. HAV-G was a recipient of a CONACyT fellowship. The authors are grateful to the Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo LabNalCit (CONACYT) IIB-UNAM and the Unidad de Microscopía IIB-UNAM for facilities, Miriam C. Guido Jiménez, M.Sc., for technical and methodological support, Carlos Castellanos, QFB, for technical support in radiation experiments, Francisco Gallardo-Vera, Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico, and Dr. Miguel Tapia-Rodríguez of IIB-UNAM for support in immunofluorescence. HAV-G is a doctoral student in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Supplementary Materials

Cell cycle analysis of HeLa SP and ML cultures at different time points after radiation. Both ML and SP cultures were either not incubated or incubated for 3, 6, 9, 12, and 24 hours after two different IR doses, fixed with 2% paraformaldehyde for 5 min, washed with PBS, and permeabilized with methanol at -20°C for 10 minutes. Cells were suspended in staining buffer (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Sigma, P4170), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A (Invitrogen, 12091-02), 0.5% Triton X-100 (USB, 22686), and PBS) for 40 min, fluorescence read on an Attune AV Flow Cytometer (BD, LabNalCit IIB-UNAM), and analyzed with FlowJo[®] software. Figure S1: no differences exist between the percentage of SP and ML cells at different cell cycles. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] D. Pectasides, K. Kamposioras, G. Papaxoinis, and E. Pectasides, "Chemotherapy for recurrent cervical cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 34, no. 7, pp. 603–613, 2008.
- [2] N. Justo, N. Wilking, B. Jonsson, S. Luciani, and E. Cazap, "A review of breast cancer care and outcomes in Latin America," *The Oncologist*, vol. 18, no. 3, pp. 248–256, 2013.
- [3] M. J. Grimshaw, L. Cooper, K. Papazisis et al., "Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells," *Breast Cancer Research*, vol. 10, no. 3, article R52, 2008.
- [4] D. Ponti, A. Costa, N. Zaffaroni et al., "Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties," *Cancer Research*, vol. 65, no. 13, pp. 5506–5511, 2005.
- [5] J. D. Lathia, J. Gallagher, J. M. Heddleston et al., "Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells," *Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 421–432, 2010.
- [6] B. Corominas-Faja, C. Oliveras-Ferreros, E. Cuyàs et al., "Stem cell-like ALDH^{bright} cellular states in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a novel mechanism of acquired resistance to erlotinib targetable with the natural polyphenol silibinin," *Cell Cycle*, vol. 12, no. 21, pp. 3390–3404, 2013.
- [7] L. Lundholm, P. Hååg, D. Zong et al., "Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest," *Cell Death & Disease*, vol. 4, no. 1, article e478, 2013.
- [8] M. Cariati, A. Naderi, J. P. Brown et al., "Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line," *International Journal of Cancer*, vol. 122, no. 2, pp. 298–304, 2008.
- [9] G. Dontu, W. M. Abdallah, J. M. Foley et al., "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells," *Genes and Development*, vol. 17, no. 10, pp. 1253–1270, 2003.
- [10] H. L. Goel, T. Gritsko, B. Pursell et al., "Regulated splicing of the A6 integrin cytoplasmic domain determines the fate of breast cancer stem cells," *Cell Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 747–761, 2014.
- [11] A. F. Schott, M. D. Landis, G. Dontu et al., "Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 6, pp. 1512–1524, 2013.
- [12] P. H. Krebsbach and L. G. Villa-Diaz, "The role of integrin A6 (CD49f) in stem cells: more than a conserved biomarker," *Stem Cells and Development*, vol. 26, no. 15, pp. 1090–1099, 2017.
- [13] A. M. Belkin and M. A. Stepp, "Integrins as receptors for laminins," *Microscopy Research and Technique*, vol. 51, no. 3, pp. 280–301, 2000.
- [14] S. O. Yoon, S. Shin, and E. A. Lipscomb, "A novel mechanism for integrin-mediated Ras activation in breast carcinoma cells: the $\text{A}_6\beta_1$ integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling," *Cancer Research*, vol. 66, no. 5, pp. 2732–2739, 2006.
- [15] T. Hou, W. Zhang, C. Tong et al., "Putative stem cell markers in cervical squamous cell carcinoma are correlated with poor clinical outcome," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 785, 2015.
- [16] C. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret et al., "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 5, pp. 555–567, 2007.
- [17] T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu et al., "Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 12, pp. 4234–4241, 2009.
- [18] H. Fukamachi, H. S. Seol, S. Shimada et al., "CD49f^{high} cells retain sphere-forming and tumor-initiating activities in human gastric tumors," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, article e72438, 2013.
- [19] Q. Xie, J. Liang, Q. Rao et al., "Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts chemoresistance and poor clinical

- outcomes in patients with locally advanced cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy prior to radical hysterectomy," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 23, no. 1, pp. 163–170, 2016.
- [20] P. Dalerba, R. W. Cho, and M. F. Clarke, "Cancer stem cells: models and concepts," *Annual Review of Medicine*, vol. 58, no. 1, pp. 267–284, 2007.
- [21] H. Ishii, M. Iwatsuki, K. Ieta et al., "Cancer stem cells and chemoradiation resistance," *Cancer Science*, vol. 99, no. 10, pp. 1871–1877, 2008.
- [22] M. Maugeri-Saccà, P. Vigneri, and R. De Maria, "Cancer stem cells and chemosensitivity," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 15, pp. 4942–4947, 2011.
- [23] C. Blanpain, M. Mohrin, P. A. Sotiropoulou, and E. Passegue, "DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 16–29, 2011.
- [24] M. Maugeri-Sacca, M. Bartucci, and R. De Maria, "DNA damage repair pathways in cancer stem cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11, no. 8, pp. 1627–1636, 2012.
- [25] A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kaçmaz, and S. Linn, "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 73, no. 1, pp. 39–85, 2004.
- [26] M. Gilibert, S. Launay, C. Ginestier et al., "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, article e104302, 2014.
- [27] A. Gonçalves, P. Finetti, R. Sabatier et al., "Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: a meta-analysis," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 127, no. 1, pp. 273–281, 2011.
- [28] G. von Minckwitz, B. M. Müller, S. Loibl et al., "Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 16, pp. 2150–2157, 2011.
- [29] I. Bortolomai, S. Canevari, I. Facetti et al., "Tumor initiating cells: development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 6, pp. 1194–1206, 2010.
- [30] D. Feng, C. Peng, C. Li et al., "Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri," *Oncology Reports*, vol. 22, no. 5, pp. 1129–1134, 2009.
- [31] W. Gu, E. Yeo, N. McMillan, and C. Yu, "Silencing oncogene expression in cervical cancer stem-like cells inhibits their cell growth and self-renewal ability," *Cancer Gene Therapy*, vol. 18, no. 12, pp. 897–905, 2011.
- [32] X.-s. Li, Q. Xu, X.-y. Fu, and W.-s. Luo, "ALDH1A1 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 705, 2014.
- [33] S.-Y. Liu and P.-S. Zheng, "High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer," *Oncotarget*, vol. 4, no. 12, pp. 2462–2475, 2013.
- [34] J. López, A. Poitevin, V. Mendoza-Martínez, C. Pérez-Plasencia, and A. García-Carrancá, "Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance," *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 48, 2012.
- [35] E. Ortiz-Sánchez, L. Santiago-López, V. B. Cruz-Domínguez et al., "Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression," *Oncotarget*, vol. 7, no. 22, pp. 31943–31954, 2016.
- [36] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon et al., "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response," *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006.
- [37] C. J. Bakkenist and M. B. Kastan, "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation," *Nature*, vol. 421, no. 6922, pp. 499–506, 2003.
- [38] M. F. Lavin and S. Kozlov, "ATM activation and DNA damage response," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 8, pp. 931–942, 2007.
- [39] Y. Shiloh and Y. Ziv, "The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, no. 4, pp. 197–210, 2013.
- [40] W. M. Bonner, C. E. Redon, J. S. Dickey et al., "γH2AX and cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 957–967, 2008.
- [41] O. Fernandez-Capetillo, A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig, "H2AX: the histone guardian of the genome," *DNA Repair*, vol. 3, no. 8-9, pp. 959–967, 2004.
- [42] M. Baumann, M. Krause, and R. Hill, "Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 7, pp. 545–554, 2008.
- [43] S. Kumazawa, H. Kajiyama, T. Umezu et al., "Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells," *The Journal of Obstetrics and Gynecology Research*, vol. 40, no. 5, pp. 1389–1398, 2014.
- [44] L. Shen, X. Huang, X. Xie, J. Su, J. Yuan, and X. Chen, "High expression of SOX2 and OCT4 indicates radiation resistance and an independent negative prognosis in cervical squamous cell carcinoma," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 62, no. 7, pp. 499–509, 2014.
- [45] G. Ruíz, H. A. Valencia-González, I. León-Galicia, E. García-Villa, A. García-Carrancá, and P. Gariglio, "Inhibition of RAD51 by siRNA and resveratrol sensitizes cancer stem cells derived from HeLa cell cultures to apoptosis," *Stem Cells International*, vol. 2018, Article ID 2493869, 11 pages, 2018.
- [46] R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, Y. Wang, and D. Murray, "Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 11, pp. 22409–22435, 2013.

