



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

---

---

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA**

**EN CÉLULAS TRONCALES TUMORALES DERIVADAS DE  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**PRESENTA:**

**VEVERLY ANEL MENDOZA MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ**

**ASESOR INTERNO**

**M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**México, D. F.**

**JUNIO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



El presente trabajo fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Genómica Funcional y el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología con el apoyo recibido por parte del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), para el proyecto:

“MICROARREGLOS PARA DEFINIR PERFILES DE EXPRESIÓN Y EL AMBIENTE CELULAR EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y LESIONES PRECURSORAS. IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS TRONCALES TUMORALES PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCER DEL CUELLO UTERINO.”

GI/PIFUTP08-142

*Las grandes cosas exigen que no se hable de ellas  
o que se hable de ellas con grandeza:  
con grandeza quiere decir, con cinismo y con inocencia.*

*La voluntad de dominio.*

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro a mi familia

Por ser el regalo más hermoso que Dios me ha dado,  
porque son ustedes la fuerza que me anima cuando el camino es difícil,  
juntos hemos superado muchas adversidades  
y estoy segura de que lo seguiremos haciendo.

Papá te dedicó este logro que es tanto tuyo como mío,  
porque me enseñaste con el ejemplo, tu ejemplo.  
Para mí tu trabajo, perseverancia, constancia y esfuerzo  
son la mejor enseñanza de vida que puedo recibir.  
Te amo papi y estoy muy orgullosa de ti.

Mami este logro es para ti,  
porque eres el mejor ángel que me pudo dar Dios como mamá,  
me siento muy feliz y orgullosa de que tú y más aún de que seas mi mamá,  
nunca imagine que pudiera haber un lazo de amor tan fuerte  
como el que existe entre nosotras.

Papá y mamá,  
para ustedes es este logro  
resultado de esfuerzo, trabajo y dedicación constante.

Quizá estemos separados físicamente pero seguimos juntos en el corazón.  
Los amo y espero que Dios nos siga regalando muchos días juntos.

Con todo mi amor y admiración

Para Jesús y Vicky

Mis papás

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Alejandro García Carrancá muchas gracias por el todo el apoyo y la confianza que me brindo desde el primer momento que llegue a su laboratorio, parece increíble que ya sean seis años desde aquel día que inicie mi formación científica. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y motivar en mi el gusto y la dedicación a la ciencia.

Dr. Carlos Pérez Plasencia le agradezco la oportunidad y la confianza que me brindo para trabajar en su grupo investigación, gracias por su apoyo y sus consejos han sido muy útiles.

A los doctores Felipe Vaca y Verónica Fragoso, por todo el conocimiento, consejos y experiencia que me han transmitido pero sobre todo por su valiosa amistad. Vero muchas gracias por el apoyo, el cariño y la confianza que me has dado, no tengo palabras para agradecerte estar conmigo cuando menos lo espere.

A Chio, porque no solo fuiste tú la persona que comenzó mi formación técnica en un laboratorio sino que también me brindaste tu apoyo, paciencia y amistad en todo momento, mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio: Miris, Dra. Eli, José Luis, Pedro, Heriberto, Silvia, Wendy, Martha, Raque, Montse, Liz y Jorge y por los que no mencione pero de los que siempre tuve apoyo, paciencia y compañía en esos momentos de estrés donde dan ganas de desertar, gracias por los ánimos.

A mis compañeros de la facultad, porque su compañía hizo muy divertidos estos cuatro años, en las clases y salidas de campo me regalaron momentos que con mucha alegría recordare siempre, gracias chicos.

Humberto, mi mejor amigo, no sé cómo agradecerte todo el apoyo, la compañía, el cariño, tu tiempo y sobre todo la paciencia que me has tenido desde el principio y hasta el final, simplemente estudiar Biología sin ti a mi lado no lo quiero imaginar, eres increíble. Te quiero mucho niño, gracias por todo.

A mi familia, porque son ustedes mi principal motivo para salir adelante día con día, porque entre los cinco hemos caminado juntos aprendiendo a vivir la vida compartiendo en cada momento lo que esta nos ofrece, este logro no es personal es de nuestro equipo. Los amo.

A mis padres, porque gracias a su esfuerzo y la dedicación que me han dado desde el momento en que nací soy quien soy y estoy infinitamente agradecida. Gracias por el tiempo, la paciencia y todo el amor con el que me han educado, confiaron en mí y lo dieron todo sin esperar nada a cambio. Bryan y Giss, mis pequeños hermanos gracias por compartir conmigo esta vida, es genial que seamos hermanos, gracias por todo su cariño, comprensión y por todo lo que me han enseñado, créanme es más de lo que se imaginan.

Uri mi niño, gracias por acompañarme, por respetar mis ideas, mi tiempo y mi espacio, tú me has enseñado a ver el mundo diferente gracias por aceptare por tu apoyo y tu confianza, tus palabras y tu amor me acompañan siempre, soy muy feliz a tu lado.

A Dios, gracias porque siempre has estado a mi lado y porque has llenado mi vida de momentos de felicidad con mis seres queridos y porque es tu mano la que me levanta cuando caigo.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	7
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	8
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>RESUMEN</b>	10
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
a) Cáncer Cérvico Uterino	11
b) Virus de Papiloma Humano como Factor Etiológico del CaCU	11
c) Células Troncales Tumorales	12
d) Esferas no Adherentes. Ensayos In Vitro para Células Troncales Tumorales	15
e) Métodos de Análisis del Transcriptoma Celular	17
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>HIPÓTESIS</b>	21
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	22
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	23
I. Cultivos celulares	23
II. Ensayo de células no adherentes	23
III. Extracción de RNA	24
IV. Cuantificación y Verificación de la calidad de RNA	24
V. Preparación de DNA complementario	24
VI. Transcripción in vitro para sintetizar aRNA modificado.	25
VII. Cuantificación del aRNA amplificado y marcaje del aRNA	26
VIII. Purificación de aRNA marcado y análisis espectrofotométrico de la incorporación del colorante	27
IX. Pre-Hibridación de los microarreglos.	27
X. Hibridación	28
XI. Escaneo	29
XII. Pre-procesamiento de Datos	29
XIII. Análisis Bioinformático	29

<b>RESULTADOS</b>	30
I. Cultivo celular y ensayos de esferas no adherentes	30
II. Extracción de RNA	31
III. Amplificación de RNA y cuantificación de RNA amplificado	33
IV. Cuantificación de cianinas incorporadas.	34
V. Hibridación y escaneo del microarreglo	35
VI. Pre-procesamiento de datos	35
VII. Normalización de los Datos	36
VIII. Análisis Bioinformático	38
<b>DISCUSIÓN</b>	50
<b>CONCLUSIONES</b>	51
<b>PERSPECTIVAS</b>	52
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	53

*Todo hábito hace nuestra mano más ingeniosa y nuestro genio más torpe.*

*El eterno retorno*

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración y pureza del RNA total de cultivos celulares en monocapa y esferas no adherentes.	33
Tabla 2.	Rendimiento y pureza de RNA mensajero amplificado.	33
Tabla 3.	Rendimiento y calidad de las cianinas (Cy3 y Cy5) incorporadas en las muestras.	34

*El genio es desconocido y se desconoce a sí mismo:  
¡ésta es su fortuna! ¡Ay de él si se conociera!*

*Tratados filosóficos*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ensayos <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> para células tumorales.	16
Figura 2.	Cultivos celulares de SiHa y HeLa en monocapa.	30
Figura 3.	Ensayo de esferas no adherentes después de seis días de crecimiento.	31
Figura 4.	Calidad del RNA control (SiHa monocapa).	32
Figura 5.	Calidad del RNA muestra (SiHa esferoide).	32
Figura 6.	Calidad del RNA control (HeLa monocapa).	32
Figura 7.	Calidad del RNA muestra (HeLa esferoide).	32
Figura 8.	Imagen de fluorescencia de las muestras de RNA marcadas con los fluoróforos Cy3 rojo y Cy5 verde.	34
Figura 9.	Cuantificación de la señal de un microarreglo, definición y ajuste de la red.	36
Figura 10.	Comportamiento de los datos en un MA plot el después de la normalización los datos de HeLa y SiHa.	37
Figura 11.	Porcentajes de expresión de SiHa y HeLa.	38
Figura 12.	Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sobre expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de HeLa.	40
Figura 13.	Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sub expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de HeLa.	40
Figura 14.	Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sobre expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de SiHa.	41
Figura 15.	Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sub expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de SiHa.	41
Figura 16.	Marcadores de células troncales sobre expresados en la línea celular HeLa.	43
Figura 17.	Marcadores de células troncales sobre expresados en la línea celular SiHa.	43
Figura 18.	Genes involucrados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno.	44
Figura 19.	Vía de estrés oxidativo celular.	45
Figura 20.	DAG de genes sobre expresados en SiHa y HeLa.	47
Figura 21.	DAG de genes sobre expresados en SiHa y HeLa.	49

*Una vez tomada una decisión, hay que cerrar los oídos a los mejores argumentos en contrario. Éste es el indicio de un carácter fuerte. En ocasiones, hay que hacer triunfar la propia voluntad hasta la estupidez.*

*Más allá del bien y el mal*

## ABREVIATURAS

CaCU: Cáncer Cérvico Uterino

CIC: Células Iniciadoras del Cáncer

CICC: Células Iniciadoras de Cáncer Cérvico Uterino

CTHs: Células Troncales Hematopoyéticas

CTNs: Células Troncales Normales

CTTs: Células Troncales Tumorales

DAG: Directed Acyclic Graph (Gráfico Acíclico Dirigido)

E: Early (temprano)

EGF: Epidermal Growth Factor (Factor de Crecimiento Epidermal)

FGF2: Fibroblast Growth Factor 2 (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2)

GO: Gene Ontology (Ontología Genética)

L: Late (tardía)

LCR: Long Control Región (Región regulatoria no codificante)

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

NOD-SCID: Non-obese Diabetic-Severe Combined Immune Deficiency (Inmunodeficiencia severa combinada)

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression (Análisis Serial de Expresión Génica)

SP: Side Population (Población Alterna)

VPH: Virus del Papiloma Humano

*Crear: éste es el gran alivio al dolor y lo que hace fácil la vida.  
Más, para que exista un creador, hacen falta  
muchas crisis de dolor y muchas transformaciones.*

*Así hablo Zaratustra.*

## RESUMEN

En este trabajo se analizó el perfil de expresión global de poblaciones enriquecidas en células troncales tumorales (CTT), lo cual fue posible gracias al empleo de una metodología que analiza la expresión de la mayoría de los genes expresados en estas células, los microarreglos. Para ello utilizamos dos líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino (CaCU). La información obtenida permite conocer aquellos genes expresados de forma diferencial en las CTT del CaCU. Entre ellos, encontramos genes cuyos productos participan en los procesos relacionados con la radio resistencia, quimio resistencia y el proceso metastásico.

En este trabajo empleamos herramientas de análisis de expresión global que nos permitieron tener un catálogo completo de genes expresados en CaCU; gracias a esto fue posible caracterizar vías celulares en las cuales una proporción importante de genes mostró desregulación en su nivel de expresión. Los grupos de genes que se encontraron expresados de manera diferencial en las CIC incluyen componentes de: células troncales normales y tumorales, metabolismo de especies reactivas de oxígeno, reparación de daños al ADN y componentes de la transición epitelio-mesenquima, entre las principales.

La importancia de este trabajo es mostrar un primer acercamiento al perfil de expresión global de las vías metabólicas alteradas y los genes que participan en el desarrollo de CaCU, con el objeto de incrementar nuestro conocimiento sobre las alteraciones moleculares en poblaciones celulares enriquecidas con células iniciadoras de este tipo de cáncer.

**Palabras clave:** célula troncal tumoral, cáncer cérvico uterino, microarreglo.

*No tenemos oídos para las cosas a las cuales no nos han dado aún acceso los acontecimientos de la vida.*

*Ecce homo.*

## INTRODUCCIÓN

### a) Cáncer Cérvico Uterino

Epidemiología de la enfermedad.

El cáncer cervico uterino (CaCu) representa el segundo tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres. En la escala global, se reportan cerca de 530,000 nuevos casos cada año y más de 274, 000 muertes en todo el mundo. El CaCU es un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo y constituye una de las principales causas de muerte en las mujeres de 35 a 60 años de edad. En México, de acuerdo a las estadísticas reportadas por la Secretaría de Salud el CaCU es la segunda causa de muerte en mujeres por tumores malignos. En 2008, se reportaron 4,031 defunciones con una tasa de 7.4 por 100 000 mujeres, con esto se estima que en ese año, murieron 11 mujeres por día (Informática 2008).

### b) Virus de Papiloma Humano como Factor Etiológico del CaCU

El factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCU es la infección persistente con Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo (Schiffman, Bauer et al. 1993; Walboomers, Jacobs et al. 1999; Munoz 2000; Bosch, Lorincz et al. 2002). Los VPH se han clasificado en función del tipo de tejido que infectan (piel y mucosas) y en asociación con el grado de la lesión (de alto y bajo grado) (de Villiers 1994). Un tipo viral se define con base en una diferencia de al menos 10% en la secuencia nucleotídica, cuando la diferencia es de 2-10%, se trata de un subtipo (zur Hausen 1999).

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*; su genoma es una molécula de ADN bicatenaria, circular que mide alrededor de ocho kilobases. El virión consiste de una cápside de 72 unidades o capsómeros que están compuestos de dos proteínas estructurales: L1 la cual constituye 80% de la partícula viral y L2. El genoma viral se divide en tres regiones: la temprana (E), la tardía (L) y una región regulatoria no codificante (LCR) (Park, Fujiwara et al. 1995). La región regulatoria presenta diferentes sitios de unión tanto para represores como activadores de la transcripción (Turek 1994). En la región temprana se encuentran genes involucrados en la promoción de la carcinogénesis (*E1-E7*). Estos genes se expresan en las células de los estratos basal e intermedio del epitelio escamo-estratificado (Palefsky and Holly 1995).

Actualmente, se han identificado más de 100 tipos virales, los cuales han sido clasificados en 16 grupos (Bernard, Chan et al. 1994). En las lesiones de bajo grado, (condiloma y neoplasia intraepitelial cervical I, NIC I) predominan los tipos 6 y 11 (de bajo riesgo), encontrándose en aproximadamente 20-22% de los casos. En las displasias de alto grado (NIC II y NIC III) predomina el tipo 16, que es detectado en 30-77% de los casos; adicionalmente, 37.4-41% de estas lesiones están también relacionadas con el tipo 18 y algunos virus del grupo de los treinta (31, 33, 35, 39, etc.). Para los carcinomas infiltrantes se ha realizado una actualización de la clasificación epidemiológica de los tipos virales presentes en estas neoplasias. Así, en el grupo de alto riesgo se encuentran los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; asimismo, se considera a los tipos 26, 53 y 66 como de probable capacidad carcinogénica, los cuales al igual que los tipos 73 y 82 han sido reclasificados de un grupo anteriormente como de riesgo indeterminado al ser incluidos en los de alto riesgo. En el grupo de bajo riesgo están los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81. Los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 se encuentran en más de 95% de los carcinomas escamosos (Munoz 2000).

Para establecer una infección productiva, el VPH debe tener acceso a las células que tienen la capacidad de proliferar es decir, las del estrato basal del epitelio cervical (zur Hausen 1996). Una vez que el VPH ha infectado a las células basales, el genoma viral se replica activamente para lo cual se mantiene en forma circular libre o episomal distribuyéndose a cada célula hija durante la división celular (Matsukura, Koi et al. 1989).

Diferentes reportes indican que la prevalencia de infección con VPH de alto riesgo en CaCU es superior a 99.7% de los casos y que la probabilidad de desarrollar una lesión intraepitelial cervical de alto grado se incrementa al menos 100 veces en mujeres infectadas con estos tipos virales, comparadas con mujeres no infectadas (zur Hausen 1996).

### **c) Células Troncales Tumorales**

Al igual que los tejidos normales, los tejidos tumorales están formados por poblaciones celulares heterogéneas que difieren por su aparente estado de diferenciación. Sin duda, las características de diferenciación de un tumor, tanto morfológicas como estructurales son un parámetro esencial utilizado en la rutina clínica para definir el origen, tipo y grado del tumor primario. Esta simple observación sugiere que los tumores no son meramente una expansión clonal de células sino que en realidad podrían equivaler a “órganos anormales” formados por una población enferma de células iniciadoras del cáncer (CIC), las cuales tienen la capacidad

de autorenovarse y de someterse a una diferenciación aberrante. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas en una única célula blanco, a veces durante un período de varios años. Debido a que las células troncales son las únicas células de vida larga en muchos tejidos, ellas son los candidatos idóneos en donde las mutaciones transformantes tempranas se pueden acumular.

Actualmente se considera que existen dos modelos de carcinogénesis, el jerárquico y el de evolución clonal. El modelo de evolución clonal o clásico plantea que todas y cada una de las células que constituyen un tumor tienen la potencialidad de regenerar un nuevo tumor, mientras que el modelo jerárquico, recientemente desarrollado, propone que sólo una pequeña subpoblación celular, inferior a 1%, tiene la capacidad de desarrollar y mantener el genotipo maligno; a esta subpoblación se le han dado diferentes denominaciones: células iniciadoras de tumor, carcinogénicas, tumorigénicas, SP (*Side Population*), con nombres de antígenos de superficie o bajo el término de células troncales tumorales (CTTs).

Las CTTs y las células troncales normales (CTNs) comparten dos características fundamentales que las distinguen de otros tipos celulares: tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en uno o varios linajes celulares. Adicionalmente, tanto las CTTs como las CTNs son poblaciones escasas, permanecen principalmente en estado de quiescencia, son células indiferenciadas y poseen un alto potencial proliferativo. No obstante, en las CTTs el delicado balance regulatorio que gobierna las rutas de señalización de los procesos de autorrenovación, proliferación y diferenciación celular, se encuentra alterado. De hecho, actualmente se propone que el cáncer es una enfermedad basada en la desregulación de la autorrenovación de CTNs y/o progenitores, que tiene como consecuencia la expansión incontrolada y la diferenciación anormal de la población celular (Al-Hajj and Clarke 2004). La Asociación Americana de Investigación en Cáncer definió por consenso una CTT como “una célula localizada dentro de un tumor que puede autorrenovarse y generar los diferentes linajes celulares que constituyen un tumor”, asimismo, se acordó que las restantes denominaciones corresponden a CTT putativas (Clarke, Dick et al. 2006). El origen de estas células es incierto, existiendo así diferentes teorías que postulan la aparición de CTTs a partir de CTNs, de células progenitoras e incluso por fusión de células normales con células tumorales. En cualquier escenario, diferentes procesos de activación, como inflamación, infecciones bacterianas, virales, exposición a agentes físicos, químicos o modificaciones hormonales, junto con la acumulación continua de mutaciones en células normales serían responsables de la aparición de CTTs.

En 1997 se identificaron y aislaron las primeras CTTs provenientes de una enfermedad neoplásica humana (Bonnet and Dick 1997) donde se demuestra que un pequeña población, presente en muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda, e identificada con los marcadores de superficie CD34+/CD38-, recapitula el fenotipo tumoral en ratones inmunosuprimidos (NOD-SCID, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se observa que el fenotipo encontrado es semejante al identificado previamente en células troncales hematopoyéticas (CTHs), sugiriendo de esta manera como posibles blancos de transformación a las CTHs. Este trabajo y el refinamiento de los ensayos funcionales con ratones NOD-SCID, abre el camino para el aislamiento de CTTs en tumores sólidos. De esta manera, en el 2003 se da a conocer el primer reporte de CTTs en cáncer de seno (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Posteriormente y a lo largo del último lustro, se ha sumado evidencia experimental que sugiere la presencia de un grupo de células con propiedades semejantes a las células troncales normales (CTNs), en otros tumores sólidos como cerebro, (Hemmati, Nakano et al. 2003; Singh, Clarke et al. 2003; Galli, Binda et al. 2004; Singh, Hawkins et al. 2004; Yuan, Curtin et al. 2004) colon, (Dalerba, Dylla et al. 2007; O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) próstata, (Richardson, Robson et al. 2004; Collins, Berry et al. 2005; Xin, Lawson et al. 2005) ovario, (Bapat, Mali et al. 2005; Szotek, Pieretti-Vanmarcke et al. 2006) pulmón, (Kim, Jackson et al. 2005) cuello y cabeza (Prince, Sivanandan et al. 2007) y páncreas (Li, Heidt et al. 2007).

La identificación de CTTs se basa en análisis inmunofenotípicos seguidos de ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. Diferentes anticuerpos para antígenos de superficie se han empleado en este caso: CD24, CD34, CD38, CD44, CD49, CD133, ESA y EpCAM, entre otros. De igual manera, se ha empleado la tinción de Hoescht, basada en la exclusión del colorante por bombas dependientes de ATP localizadas mayoritariamente en la membrana plasmática de las células troncales (Goodell, Brose et al. 1996). Una vez separadas las subpoblaciones celulares, es posible verificar la capacidad de autorenovación y diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

Algunos ensayos *in vitro* contemplados para la discriminación de CTTs son la formación de agregados flotantes, resistencia a fármacos y clonogenicidad. *In vivo*, se verifica la capacidad de las subpoblaciones de desarrollar y mantener un tumor a lo largo de varios trasplantes seriados en modelos animales, evaluando tanto la capacidad de recapitular el tumor original a través de marcadores de diferenciación, como la capacidad de autorenovación mediante la identificación de la subpoblación inicial en cada trasplante (Dalerba, Cho et al. 2007).

De acuerdo al modelo de las CTT, sólo este grupo específico de la población celular tumoral, podría ser capaz de mantener el crecimiento de un tumor, mientras que el resto de la población celular tumoral (células diferenciadas de vida corta) no podría. Este supuesto ha sido confirmado en repetidas ocasiones en varios tipos de sistemas tumorales y las tres observaciones clave que clásicamente definen la existencia de una población de CTT son: (Natarajan and FitzGerald 2007)

1. Están dotadas con potencial tumorigénico cuando son trasplantadas a ratones inmunosuprimidos.
2. Se caracterizan por un perfil de marcadores de superficie característico con el cual pueden ser diferencial y reproduciblemente aisladas de las no tumorigénicas por medio de citometría de flujo u otros procedimientos de inmunoselección.
3. Los tumores que se forman a partir de células tumorigénicas contienen poblaciones mixtas de células cancerosas tumorigénicas y no tumorigénicas, con lo cual se recrea completamente la heterogeneidad fenotípica del tumor de origen.

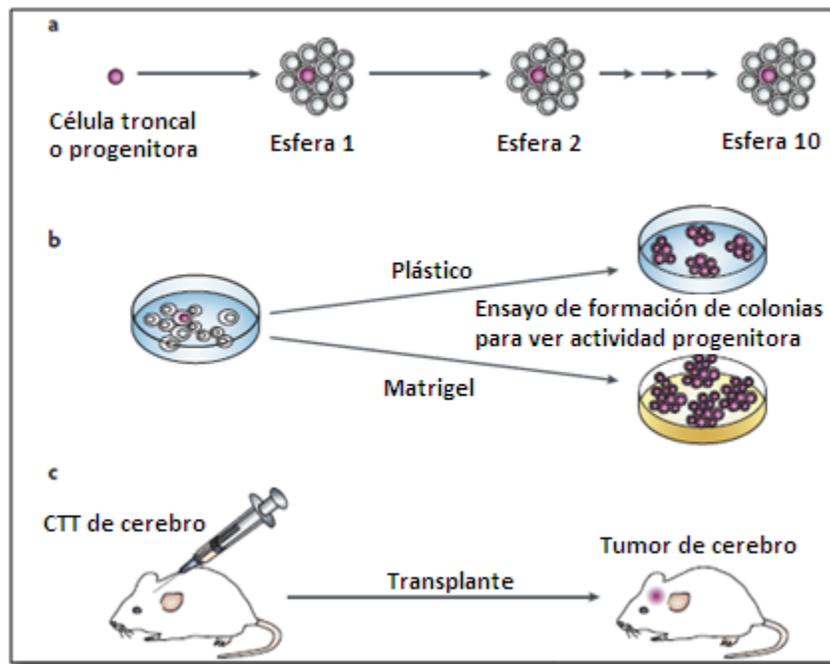
Es importante señalar que, basado en esta propuesta, el término CTT representa una definición de trabajo con un significado puramente operacional. El término es empleado para referirse a un grupo de células iniciadoras de tumor que pueden dar origen a una progenie heterogénea de composición similar al tejido del cual fue originalmente aislado. En muchos casos no es posible definir con certeza la relación genealógica entre las CTT y las células troncales normales de los tejidos correspondientes, es decir, si las CTT se originaron directamente de células troncales normales o bien de estadios tempranos de su progenie. Independientemente del origen de las CTT la identificación de una población de CTT refiere la existencia de una jerarquía funcional dentro del tejido tumoral que abarca tanto la autorenovación como la diferenciación como señas de identidad de células troncales (Lobo, Shimono et al. 2007).

#### **d) Esferas no Adherentes. Ensayos *In Vitro* para Células Troncales Tumorales**

Aunque los estudios de trasplantes ortotópicos son la prueba de oro tanto para CTN como para CTT, se requiere un tiempo sustancial para llevarlos a cabo, por tal razón, los ensayos de esferas no adherentes son cada vez más utilizadas para evaluar la actividad de las células troncales de tejidos normales como de CTT putativas. Tanto las células cancerosas como las células normales de diversos órganos pueden ser expandidas como agregados celulares no adherentes en un medio libre de suero y que contenga factor de crecimiento epidermal (EGF) y

factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2). A las células que crecen bajo estas condiciones se les conoce como esferas no adherentes (Visvader and Lindeman 2008).

El modelo de la neuroesfera ha sido ampliamente utilizado para estudiar la neurogénesis y representa el ensayo de formación de esferas mejor estudiado, en términos de clonalidad y diferenciación multipotencial (Marshall, Reynolds et al. 2007). El ensayo de esferas, originalmente desarrollado para células neurales, ha formado una base importante para el desarrollo de ensayos *in vitro* tanto de CTN y sus progenitoras como de células iniciadoras de tumores en una gran variedad de tumores sólidos (Reynolds and Rietze 2005) incluyendo cerebro (Hemmati, Nakano et al. 2003) y mama (Dontu, Abdallah et al. 2003).



**Figura 1. Ensayos *ex vivo* e *in vivo* para células tumorales.** (Visvader and Lindeman 2008)

**A.** El ensayo de esferas no adherentes predice que una célula troncal tumoral (CTT) puede ser pasada de manera serial por muchos ciclos y que esta esfera tumoral será parecida a la esfera primaria en cada caso. **B.** Las células tumorales pueden ser pasadas directamente en plástico o embebidas en Matrigel, un sustituto base para la membrana. Cada ensayo de formación de colonias representa una lectura para la actividad celular del progenitor. Las células troncales y sus progenitoras no pueden distinguirse en estos ensayos. **C.** La prueba de oro estándar para evaluar la presencia de células troncales tumorales es un trasplante ortotópico de subpoblaciones humanas en un ratón inmunocomprometido.

Tanto en osteosarcomas como en el sarcoma de Ewing se ha observado que las poblaciones troncales son enriquecidas mediante la formación de sarcoesferas (análogas a las neuroesferas). Sin embargo los protocolos de separación pueden ser percibidos como una serie de límites dentro del espectro de heterogeneidad y que la fracción celular resultante de troncalidad sólo es relevante dentro del contexto de los parámetros de enriquecimiento empleados (Lobo, Shimono et al. 2007).

Además de la capacidad de autorenovación, ninguna otra característica fenotípica es exclusiva de la población celular troncal. Por tal motivo la separación basada en una única característica podría producir una población heterogénea de la cual sólo una pequeña fracción representa células troncales. Identificar la coexpresión de varias características provee un enriquecimiento de la población y disminuye la heterogeneidad. En este sentido, las células troncales podrían ser identificadas por la coexpresión de un número indefinido de características aún no descritas.

Aunque los tumores son la fuente primaria de CTTs, las líneas celulares representan una fuente alternativa debido a la escasez de esta subpoblación; además, a diferencia del manejo directo de muestras tumorales, las líneas celulares no contienen CTNs contaminantes y se omite la variabilidad entre muestras. Estas características hacen que las líneas celulares sean viables herramientas experimentales *in vitro* para el abordaje de los mecanismos involucrados en el origen, mantenimiento y regulación de CTTs bajo condiciones controladas.

#### **e) Métodos de Análisis del Transcriptoma Celular**

Existen numerosas técnicas que han sido usadas para caracterizar el perfil de expresión de las células troncales. Dentro de éstas se encuentra el análisis de expresión génica en serie (Serial Analysis of Gene Expression SAGE, por sus siglas en inglés), microarreglos de oligonucleótidos y microarreglos de cDNA (Quackenbush 2001). Así, los microarreglos de cDNA y de oligonucleótidos son los métodos más accesibles para estudiar el transcriptoma, pues permiten medir el nivel de expresión de cientos de genes simultáneamente. Esto genera la oportunidad de hacer una comparación global de los patrones de expresión génica entre diferentes poblaciones celulares (Piscaglia, Shupe et al. 2007).

Los microarreglos han sido utilizados en la investigación de las células troncales para identificar características o señales de expresión que definen y caracterizan sus programas de diferenciación hacia linajes específicos. Con esta metodología se puede generar un catálogo de

genes expresados permitiendo comprender las vías de regulación así como identificar nuevos marcadores para caracterizar a las CTT.

La identificación de diferencias en células troncales tumorales y su contraparte normal, a nivel molecular, abre importantes expectativas en cuanto a los mecanismos que propician el desarrollo de un cáncer. Identificar a estos actores, específicos a cada enfermedad, no sólo nos permitirá tener las herramientas necesarias para pronosticar y diagnosticar eficientemente, sino que, por otra parte, podremos comprender mejor el fenómeno analizado y con una mayor resolución que hace algunos años.

Por otra parte, se ha observado que en los tejidos neoplásicos usualmente hay un aumento en la expresión de genes asociados con la proliferación y supervivencia y una disminución en genes involucrados en la diferenciación. Además, se encontró que cerca de 1, 000 transcritos se expresaban en todos los tejidos estudiados, los cuales representan el “transcriptoma mínimo” es decir, aquellos genes cuya expresión es necesaria para mantener la maquinaria celular funcional (Yu, Zhang et al. 1999; Quackenbush 2001).

Como se ve, podemos explicar la gran variedad de células en un organismo por medio de la expresión diferencial de genes de un mismo genoma, por lo que la expresión génica celular puede proporcionar información de la célula y de las relaciones entre los genes y su genoma. El monitoreo preciso de la expresión génica representa un paso esencial en el entendimiento de las propiedades o el estado de las células de interés (Piscaglia, Shupe et al. 2007).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

En general, los tumores sufren una continua acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que les permite inhibir controles celulares y ambientales. Existe un gran número de trabajos que describen la participación de diferentes genes en la regulación de estos procesos. Sin embargo, técnicas genómicas de análisis sugieren que el número de estos genes puede ser mayor.

La caracterización de perfiles globales de expresión puede ayudar a elucidar procesos biológicos importantes tanto en células tumorales como normales. La información que se conoce respecto a la biología de las CIC es escasa y más aún en CaCU, en este sentido, este proyecto propone caracterizar el perfil de expresión génico de poblaciones celulares enriquecidas con células iniciadoras de cáncer cérvico uterino (CICC).

La identificación de diferencias en el perfil de expresión genético entre las CICC y su contraparte normal a nivel molecular, abre importantes expectativas en cuanto a los mecanismos que propician el desarrollo de un cáncer. Identificar estos actores específicos nos permitirá tener las herramientas necesarias para pronosticar y diagnosticar de una manera más eficiente dicha enfermedad, además, podremos comprender mejor el fenómeno analizado y a una mayor resolución que hace algunos años.

*El éxito no está siempre en la victoria, sino a veces también en el deseo de vencer.*

*Humano, demasiado humano.*

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer el perfil de expresión genética global de poblaciones enriquecidas con CICC, a partir de las líneas celulares SiHa y HeLa.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Cultivar las líneas celulares SiHa y HeLa en monocapa.
2. Enriquecer con CICC los cultivos de las líneas celulares SiHa y HeLa mediante el ensayo de esferas no adherentes.
3. Extraer RNA de cultivos en monocapa de células tumorales y de cultivos enriquecidos con CICC de las líneas celulares SiHa y HeLa.
4. Sintetizar cDNA a partir de estos RNAs, amplificar y marcar con fluorocromos rojo y verde.
5. Identificar los genes sobre expresados y sub expresados en las poblaciones enriquecidas con CICC utilizando microarreglos.
6. Identificar de forma preliminar algunas de las vías o los mecanismos que regulan el metabolismo de una CICC con el uso de herramientas bioinformáticas.

*El destino de los hombres está hecho de momentos felices –toda vida los tiene–, pero no de épocas felices.*

*Tratados filosóficos.*

## **HIPÓTESIS**

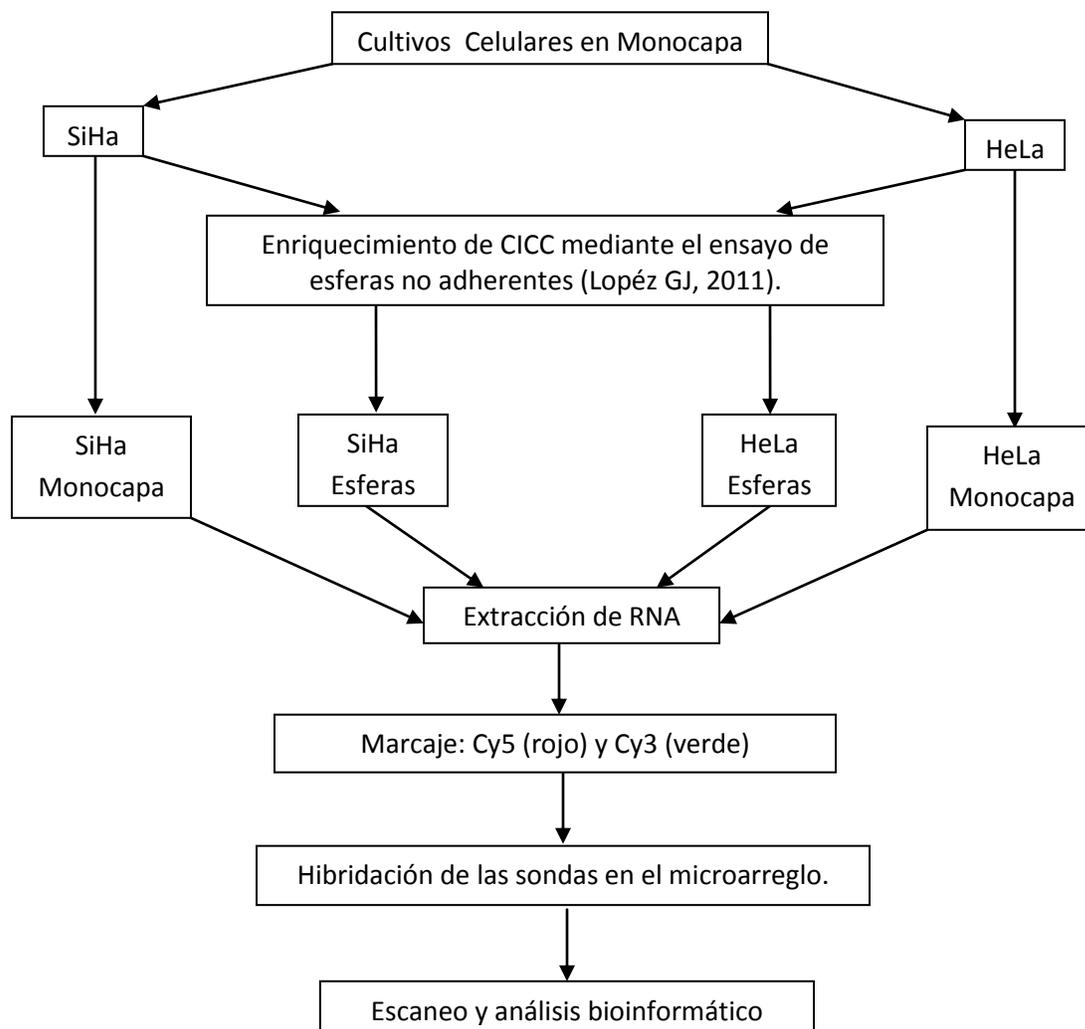
Existen diferencias entre el perfil de expresión genético global de CICC (esferas no adherentes) y sus progenie diferenciada (células en monocapa), lo cual se verá reflejado en la expresión de marcadores específicos de células troncales y sus cascadas de señalización.

*Las palabras más tranquilas son las que levantan la tempestad; los pensamientos que caminan con pies de paloma dirigen el mundo.*

*Ecce homo.*

## DISEÑO EXPERIMENTAL

En el diseño experimental propuesto para este proyecto se utilizaron las líneas celulares HeLa y SiHa. A partir de cultivos en monocapa se generaron cultivos de esferas no adherentes para enriquecer la población de CICC (López GJ, 2011). Posteriormente, se hizo la extracción de RNA de los cultivos; los controles, cultivos en monocapa y los experimentales, cultivos de poblaciones enriquecidas con CICC. El RNA fue marcado con fluorocromos, los controles Cy3 (color verde) y los experimentales Cy5 (color rojo), posteriormente se hibridaron en el microarreglo. Finalmente se escanearon y analizaron con herramientas bioinformáticas.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I. Cultivos celulares**

Se emplearon las líneas celulares HeLa y SiHa provenientes de la ATCC, las cuales fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomycin, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Empleando las condiciones antes mencionadas se obtuvieron cultivos en monocapa, los cuales se utilizaron con 75% de confluencia de una caja de cultivo de 10 cm de diámetro, posteriormente se disociaron con Verseno (NaCl 137 mM, KCl 5.3 mM, Tris Base 3.04 g/L y EDTA 1.07 mM) y finalmente se extrajo el RNA.

### **II. Ensayo de células no adherentes**

El ensayo de células no adherentes se realizó a partir de un cultivo de células creciendo en monocapa, las cuales, con una confluencia de 75% de una caja de cultivo de 10 cm de diámetro se utilizaron para la propagación de los agregados esféricos<sup>1</sup> de acuerdo a lo reportado por López Gil, 2011. Las líneas celulares (SiHa y HeLa) fueron disociadas con Verseno (NaCl 137 mM, KCl 5.3 mM, Tris Base 3.04 g/L y EDTA 1.07 mM), posteriormente se cosecharon nuevos cultivos en cajas petri que fueron mantenidos con DMEM-F12 (12500-062, Invitrogen Gibco), Knockout SR (10828-028, Invitrogen Gibco) 15%, factor de crecimiento epidermal (13247051, Invitrogen) 20 ng/mL, factor de crecimiento de fibroblastos (PHG0261, Invitrogen) 20 ng/mL, insulina (I9278, Sigma Aldrich) 5 µg/mL, albúmina de suero fetal (735078, Roche Applied Science) 0.4%, 100 unidades/mL de Penicilina G y 100 ug/mL de Estreptomycin, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los agregados celulares flotantes se alimentaron cada dos días con medio de cultivo nuevo, al sexto día se disgregaron por disociación mecánica con una micropipeta y finalmente se hizo la extracción de RNA.

---

<sup>1</sup> La obtención de los agregados esféricos forman parte del proyecto de doctorado de López Gil Jacqueline.

### **III. Extracción de RNA**

La extracción de RNA se utilizó el método convencional de extracción con TRIZOL. Se agregó 1 mL de TRIZOL a las poblaciones celulares, dejándolas incubar durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se adicionaron 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de TRIZOL, dejando incubar por 15 minutos a TA (temperatura ambiente). Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos de 2 a 8°C, separando la fase acuosa a la cual se adicionaron 500 µL de isopropanol por cada mililitro de TRIZOL empleado, incubando por 10 minutos a TA. Nuevamente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos de 2 a 8°C y se decantó. Después la pastilla fue lavada con etanol 70% (1 mL por cada mL de TRIZOL) y centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y finalmente se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O inyectable.

### **IV. Cuantificación y Verificación de la calidad de RNA**

Para verificar la calidad y cantidad de RNA extraído, éste fue analizado con el equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent, el cual cuenta con un sistema automatizado de electroforesis capilar, que evalúa la calidad de RNA mediante la generación de perfiles de información sobre el rendimiento de la concentración de RNA y permiten una inspección visual de la integridad del RNA, asimismo, genera relaciones de aproximación entre la masa de las subunidades ribosomales.

### **V. Preparación de DNA complementario**

El RNA se amplificó con el kit Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification de Ambion (AM1753). La cantidad necesaria de RNA para realizar la amplificación del mismo es de 1 µg.

#### **Transcripción Reversa para Sintetizar cDNA**

Se mezcló 1 µg de RNA con 1 µL de OligoT7(dT), luego se ajustó hasta un volumen final de 12 µL. Enseguida se mezcló en el vortex y se dejó incubar por 10 minutos a 70°C, al finalizar se centrifugó y colocó en hielo inmediatamente.

Posteriormente se agregaron 8 µL del Mix Reverse Transcription Master y se incubó la muestra a 42°C durante dos horas, al finalizar se centrifugó y colocó en hielo.

Reverse Transcription Master Mix:

- 2  $\mu$ L 10X First Strand Buffer
- 4  $\mu$ L dNTP Mix
- 1  $\mu$ L RNase Inhibitor
- 1  $\mu$ L ArrayScript

### **Síntesis de cDNA**

En hielo y en el siguiente orden se preparó el Second Strand Master Mix, posteriormente a cada muestra se le agregaron 80  $\mu$ L del mix y se incubaron por dos horas a 16°C.

Second Strand Master Mix:

- 63  $\mu$ L Nuclease-Free Water
- 10  $\mu$ L 10X Second Strand Buffer
- 4  $\mu$ L dNTP Mix
- 2  $\mu$ L DNA polymerase
- 1  $\mu$ L RNase H

### **Purificación de cDNA**

Se agregaron 250  $\mu$ L del cDNA Binding Buffer a cada muestra, se mezcló y centrifugó. Enseguida se colocó la muestra en la columna con filtro para cDNA y se centrifugó por 1 minuto a 10 000rpm luego se retiró el precipitado y se colocó nuevamente la columna en el tubo.

Se colocaron 500  $\mu$ L de Wash Buffer en la columna para lavar las muestras, se centrifugó por 1 minuto a 10 000rpm, se retiró el precipitado y se colocó la columna de cDNA en el tubo de elución.

Finalmente el cDNA se eluyó agregando 18  $\mu$ L de agua libre de nucleasas calentada previamente a 55°C, se incubó durante 2 minutos y se centrifugó por 1 minuto a 10 000rpm.

### **VI. Transcripción *in vitro* para sintetizar aRNA modificado.**

A temperatura ambiente y en el siguiente orden se preparó el IVT Master Mix, posteriormente a cada muestra se le agregaron 26  $\mu$ L del mix.

IVT Master Mix:

- 3  $\mu$ L aaUTP (50mM)
- 12  $\mu$ L ATP, CTP, GTP Mix
- 3  $\mu$ L UTP Solution (50mM)
- 4  $\mu$ L T7 10X Reaction Buffer
- 4  $\mu$ L T7 Enzyme Mix

En seguida las muestras se incubaron durante 14 horas a 37°C. Al finalizar, la reacción se detuvo agregando 58  $\mu$ L de agua libre de nucleasas a cada muestra.

### **Purificación de aRNA**

Se agregaron 350  $\mu$ L de aRNA Binding Buffer a cada muestra y en seguida se agregaron 250  $\mu$ L de etanol 100%, se mezcló e inmediatamente se colocó en la columna para aRNA; la muestra se centrifugó a 10 000rpm hasta que toda la muestra atravesó la columna, se retiró el precipitado y se colocó nuevamente la columna.

En seguida se agregaron 650  $\mu$ L de Wash Buffer a cada muestra y se centrifugaron a 10 000 rpm hasta que toda la muestra atravesó la columna, luego se retiró el precipitado y se colocó la columna en un tubo de colecta de RNA.

Para la elución del aRNA se agregaron 200  $\mu$ L de agua libre de nucleasas previamente calentada a 55°C, se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó por dos minutos a 10 000 rpm.

### **VII. Cuantificación del aRNA amplificado y marcaje del aRNA**

La cuantificación del aRNA amplificado se realizó con el NanoDrop (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.) a 260/280nm de longitud de onda. Para preparar los colorantes del marcaje se agregaron 11  $\mu$ L de DMSO a cada tubo de Cy3 y Cy 5, se mezcló vigorosamente y se mantuvo en la oscuridad.

Se colocaron 10  $\mu$ g de aRNA (Amino Allyl) de cada muestra en un tubo y se secaron en el Speed Vac evitando que se sobresecaran, posteriormente a cada tubo se colocaron 9  $\mu$ L de Coupling Buffer y 11  $\mu$ L del colorante previamente elaborado, se mezclaron perfectamente y se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Después se agregaron 4.5  $\mu$ L de Hidroxilamina 4 M a cada muestra y se incubaron durante 15 minutos más a temperatura ambiente y en oscuridad; por último, se agregaron 5.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 30  $\mu$ L de cada muestra.

### **VIII. Purificación de aRNA marcado y análisis espectrofotométrico de la incorporación del colorante**

A cada muestra se le agregaron 105  $\mu$ L de aRNA Bindind Buffer y 75  $\mu$ L de etanol 100% se mezcló e inmediatamente se colocó en la columna con filtro para aRNA marcado. Se centrifugó por un minuto a 10 000 rpm, se desechó el precipitado y se colocó la columna nuevamente en el tubo.

Se agregaron 500  $\mu$ L de Wash Buffer a cada tubo para lavar las muestras, luego se centrifugó por un minuto a 10 000 rpm, y la columna se transfirió al tubo de elución.

Se eluyó el aRNA con 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y previamente calentada a 55°C, se dejó incubar durante dos minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó por dos minutos a 10 000 rpm. El paso anterior se repitió hasta que el filtro de cada columna ya no presentaba color.

La cuantificación del aRNA marcado se realizó con el NanoDrop (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.) a 260/280nm de longitud de onda.

### **IX. Pre-Hibridación de los microarreglos.**

Antes de hibridar las muestras en la plataforma, éstas recibieron un pre-tratamiento con la solución de pre-hibridación. Las cámaras de incubación fueron lavadas con agua destilada y miliQ.

Se prepararon 40mL de solución de pre-Hibridación, lo suficiente para llenar la capacidad de la cámara y cubrir toda la superficie de las plataformas, para ello se requirió mezclar 39.6mL de DIG Easy Hyb y 0.4mL de BSA 0.1mg/mL.

Las plataformas se colocaron dentro de la cámara y se incubaron con la solución de pre-hibridación durante una hora a 42°C. Al finalizar el tiempo de incubación se hizo un lavado con SSC 0.1X durante 5 minutos, en seguida se lavó con agua miliQ e inmediatamente se

centrifugó durante 10 minutos a 1100 rpm hasta que las plataformas estuvieron perfectamente secas.

## **X. Hibridación**

### **Preparación de aRNA marcado para la hibridación**

Se utilizaron los microarreglos de la universidad de Stanford que contienen 40000 secuencias (oligonucleótidos) depositadas sobre la superficie del mismo. Se requieren 500 pmol de aRNA marcado para hibridarse en el microarreglo.

Se colocaron 500 pmol de muestra control y variable (total 1000 pmol) en un tubo y se dejó secar en el Speed Vac. Luego se agregaron 9  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L de reactivo de fragmentación se mezcló y se dejó incubar por 15 minutos a 70°C.

Posteriormente, a cada tubo se agregaron 1  $\mu$ L de Buffer de Paro, 50  $\mu$ L de tRNA y 50  $\mu$ g de Human-Cot, se mezclaron perfectamente y se centrifugó. En seguida se colocaron en el Speed Vac para disminuir su volumen hasta 5  $\mu$ L, luego se agregaron 45  $\mu$ L de DigEasy y se mezcló evitando la formación de burbujas.

Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65°C y finalmente se colocó sobre el microarreglo, distribuyendo uniformemente. Se colocó un cubreobjetos sobre la misma y se dejó incubar dentro de una cámara húmeda por 18 horas a 37°C.

### **Lavados de astringencia**

Después de la incubación para la hibridación, se retiró el cubreobjetos de las plataformas (cuidadosamente) y éstas se colocaron en la cámara para lavados.

El primer lavado fue durante 5 minutos con una solución SSC 2X / SDS 0.1% en un baño previamente temperado a 42°C. Los siguientes lavados fueron a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno, el segundo fue con una solución de SSC 0.1X / SDS 0.1%, el tercero con SSC 0.1X, el cuarto con SSC 0.01X

Finalmente se hizo un último lavado muy rápido con agua miliQ e inmediatamente las plataformas se centrifugaron durante 10 minutos a 11 000 rpm hasta que estuvieron perfectamente secas.

## **XI. Escaneo**

El microarreglo fue escaneado con el equipo GenePix 4100A y analizado con el programa GenePix Pro 5.0. En el caso de HeLa la lectura se realizó a 470-450 nm; y para SiHa a 470-440nm.

## **XII. Pre-procesamiento de Datos**

Para efectos sistemáticos el pre-procesamiento de los datos tiene por objeto ajustar las variaciones que se derivan de la tecnología experimental más que de las diferencias biológicas entre las muestras de RNA. Este es un requisito esencial antes de llevar a cabo cualquier tipo de análisis e incluye los siguientes pasos:

- Diagnóstico de los puntos
- Corrección del error de fondo
- Transformación de datos
- Normalización

## **XIII. Análisis Bioinformático**

Finalmente, se generó una base de datos que proporciona información sobre la función, el proceso biológico y la localización celular de los genes que presentaron un cambio en su expresión. Asimismo, a partir de los datos obtenidos y con el uso de herramientas bioinformáticas, se hizo una caracterización preliminar de las poblaciones enriquecidas con CTT. Este experimento se realizó por duplicado como réplica técnica.

## RESULTADOS

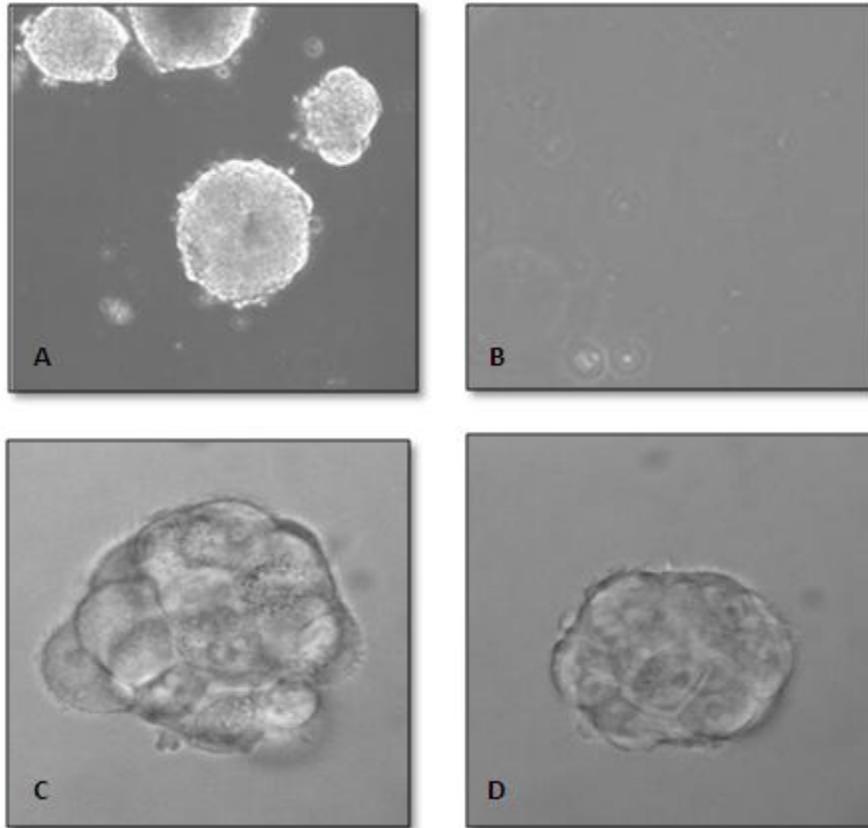
### I. Cultivo celular y ensayos de esferas no adherentes

En la figura 2 se muestran los cultivos celulares en monocapa de SiHa y HeLa con un 75% de confluencia, una vez establecidos estos cultivos se tomó una alícuota de células de los mismos para realizar el ensayo de esferas no adherentes.



**Figura 2.** Cultivos celulares de SiHa (izquierda) y HeLa (derecha) donde se muestra la condición en monocapa y una confluencia del 75%. A partir de estos cultivos se hizo el enriquecimiento de CICC mediante el ensayo de esferas no adherentes.

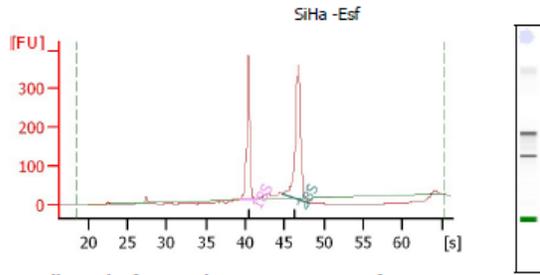
Tanto las células troncales normales como las tumorales, comparten la capacidad para formar agregados celulares flotantes bajo ciertas condiciones de cultivo. En este trabajo se empleó el ensayo de esferas no adherentes para obtener una población enriquecida con CICC a partir de cultivos de células creciendo en monocapa. En la figura 3 se observan esferas flotantes después de seis días de crecimiento de SiHa y HeLa con sus respectivos controles; MCF7 control positivo que si forma esferas y 3T3 control negativo que no forma esferas. El medio está compuesto por DMEM-F12, Knockout SR y factores de crecimiento como EGF, bFGF e insulina, entre otros.



**Figura 3.** Ensayo de esferas no adherentes después de seis días de crecimiento (medio compuesto por DMEM-F12, Knockout SR y factores de crecimiento). **A.** Control positivo con células MCF7, estas células si forman esferas flotantes. **B.** Control negativo con células 3T3, células que no forman esferas flotantes. **C.** Células SiHa formando esferas flotantes bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas. **D.** Células HeLa formando esferas flotantes bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas.

## II. Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA total de los cultivos (monocapa y esferas flotantes) con TRIzol y después las muestras fueron analizadas con el Bioanalyzer. En las figuras 4-7 se puede observar la buena integridad del material genético debido a que el número de integridad del RNA (RIN) es muy cercano a 10 (mientras más próximo a 10 mayor integridad), además la relación en cantidad de los RNA ribosomales 28S:18S es la esperada (2:1), por lo tanto estos resultados son óptimos para un experimento de microarreglos.

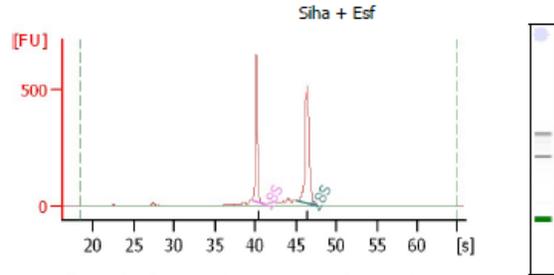


**Overall Results for sample 1 : SiHa -Esf**

RNA Area: 1,099.6  
 RNA Concentration: 863 ng/µl  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4  
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (A.01.01)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

**Fragment table for sample 1 : SiHa -Esf**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,618	2,182	410.5	37.3
28S	3,432	4,737	571.7	52.0



**Overall Results for sample 4 : SiHa + Esf**

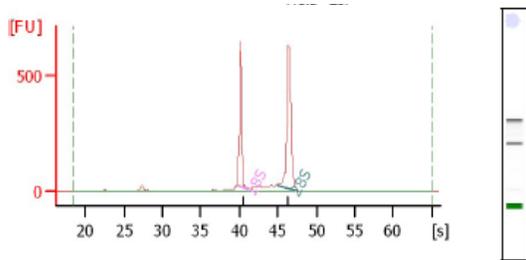
RNA Area: 1,577.3  
 RNA Concentration: 1,238 ng/µl  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.2  
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (A.01.01)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 9.60

**Fragment table for sample 4 : SiHa + Esf**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,732	2,047	493.4	31.3
28S	3,541	4,549	603.4	38.3

Figura 4. Calidad del RNA control (SiHa monocapa).  
 RIN de 9.5. RNA ribosomales 28S:18S (2:1).

Figura 5. Calidad del RNA muestra (SiHa esferoide).  
 RIN de 9.6. RNA ribosomales 28S:18S (2:1).

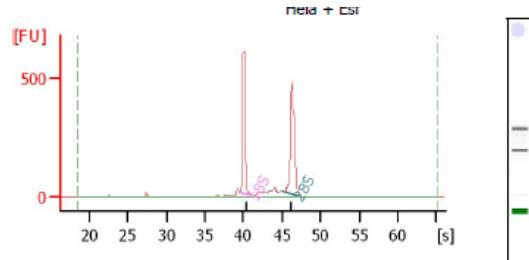


**Overall Results for sample 3 : HeLa -Esf**

RNA Area: 1,886.6  
 RNA Concentration: 1,480 ng/µl  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6  
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (A.01.01)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 9.60

**Fragment table for sample 3 : HeLa -Esf**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,740	2,061	487.2	25.8
28S	3,523	4,569	769.2	40.8



**Overall Results for sample 6 : HeLa + Esf**

RNA Area: 1,536.2  
 RNA Concentration: 1,205 ng/µl  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.2  
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (A.01.01)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

**Fragment table for sample 6 : HeLa + Esf**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,706	2,040	488.2	30.5
28S	3,541	4,499	565.8	36.8

Figura 6. Calidad del RNA control (HeLa monocapa).  
 RIN de 9.6. RNA ribosomales 28S:18S (2:1).

Figura 7. Calidad del RNA muestra (HeLa esferoide).  
 RIN de 9.5. RNA ribosomales 28S:18S (2:1).

Se cuantificó el RNA con el NanoDrop ND-1000, el cual además de valores de concentración, también proporciona valores de relación 260/280 (RNA/Proteínas, en un rango óptimo de 1.8-2) y 260/230 (RNA/solventes orgánicos, en un rango óptimo de 2-2.2) que aportan información sobre la pureza del producto.

Tabla 1. Concentración y pureza del RNA total de cultivos celulares en monocapa y esferas no adherentes.

Muestra	Concentración ng/ul	Relación RNA/Proteínas 260/280	Relación RNA/solventes orgánicos 260/230
SiHa - Mcpa	1177.51	1.97	2.23
HeLa - Mcpa	1240.96	1.94	2.22
SiHa - CICC	749.68	1.98	2.12
HeLa - CICC	910.57	2.03	1.92

### III. Amplificación de RNA y cuantificación de RNA amplificado

Para la hibridación de la muestra en el microarreglo es necesario contar con suficiente material y para ello se requiere amplificar las muestras de RNA. La amplificación proporciona un perfil de expresión más reproducible ya que al obtener una mayor cantidad de RNA se mejora la fiabilidad de los resultados. Una vez obtenido RNA total de óptima calidad se utilizó 1 µg de este para su amplificación. El RNA se amplificó con el kit MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Cat. AM1751, Ambion). Posterior a la amplificación, el RNA amplificado es modificado en el carbono 5 del anillo de la base pirimídica con un grupo amino alil, el cual posteriormente será el sustrato de las cianinas Cy3 y Cy5.

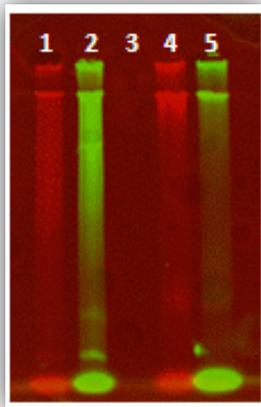
Con el propósito de corroborar una amplificación satisfactoria, se cuantificó el rendimiento obtenido en el NanoDrop a 260/280nm de longitud de onda. En la tabla 2 se observa que todas las muestras presentan una pureza óptima y que la cantidad de RNA modificado fue suficiente.

Tabla 2. Rendimiento y pureza de RNA mensajero amplificado.

Muestra	Concentración ng/uL	Relación RNA/Proteínas 260/280	Relación RNA/solventes orgánicos 260/230
SiHa - Mcpa	426.4	1.96	1.56
HeLa - Mcpa	196.7	1.94	1.71
SiHa - CICC	280.1	1.95	1.67
HeLa - CICC	239.1	1.97	1.66

#### IV. Cuantificación de cianinas incorporadas.

El rendimiento obtenido en las muestras de RNA amplificado fue óptimo para continuar con el marcado. En la figura 8 se muestra un gel de electroforesis en el que se corrieron las muestras de RNA amplificado marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5, en el observamos un patrón de barrido normal y el color incorporado en la muestra. Además de observar el gel, se hizo el análisis espectrofotométrico de la incorporación del colorante en el NanoDrop a 260/280nm de longitud de onda (Tabla 3).



1. SiHa Cy5 CICC
2. SiHa Cy3 Ctrl
3. HeLa Cy5 CICC
4. HeLa Cy3 Ctrl

**Figura 8.** Imagen de fluorescencia de las muestras de RNA marcadas con los fluoróforos Cy3 rojo y Cy5verde, corridas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida de 12.5%. Se observa un barrido en los carriles presentando un patrón normal.

Tabla 3. Rendimiento y calidad de las cianinas (Cy3 y Cy5) incorporadas en las muestras.

Cy5	Cy3	Concentración de cianinas incorporadas pmol/uL	Relación RNA/Proteínas 260/280	Concentración ng/uL
SiHa CICC		16.9	1.82	164.0
HeLa CICC		14.9	1.87	186.1
	SiHa Mcpa	21.4	1.71	124.4
	HeLa Mcpa	27	1.69	153.9

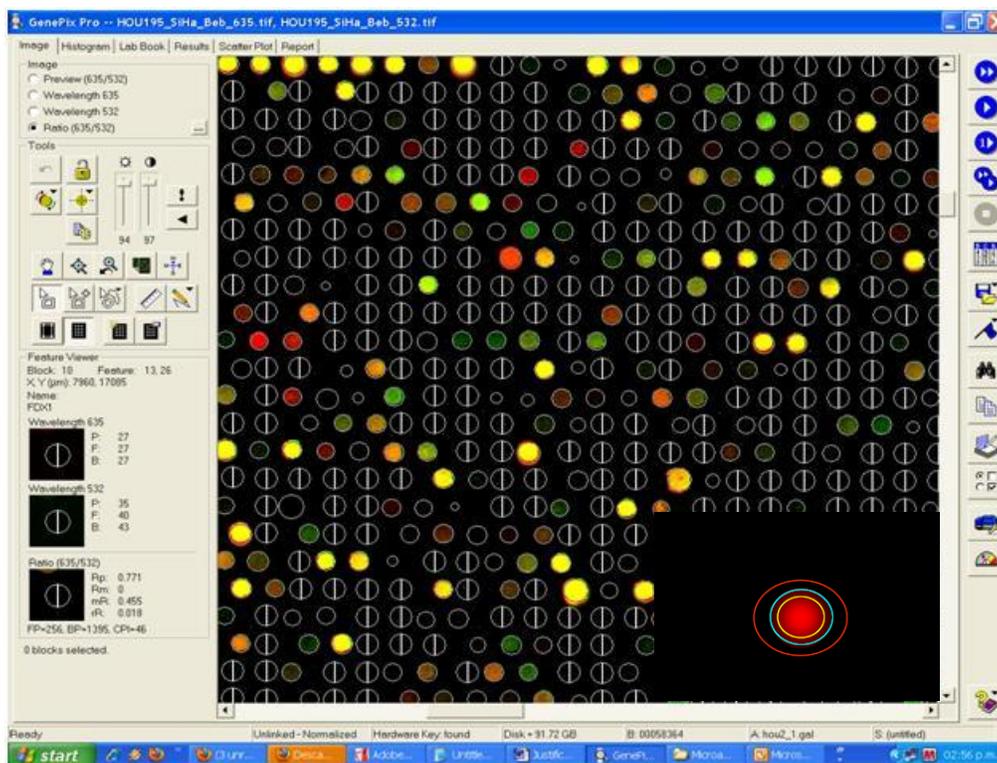
## **V. Hibridación y escaneo del microarreglo**

Se utilizaron 500 pmol de RNA marcado para hibridarse en la plataforma del microarreglo. La imagen que se obtuvo del proceso de hibridación, es reflejo del nivel de expresión de cada gen (Figura 9), ya que el tipo de microarreglo que elegimos permite obtener el perfil de expresión global de una condición particular. Esto significa que el nivel de expresión para cada gen se manifiesta por la intensidad de fluorescencia en el punto correspondiente. Por otra parte, gracias al empleo de controles tanto positivos como negativos, es posible tener un estricto control en la calidad del experimento.

## **VI. Pre-procesamiento de datos**

Una vez que se verificó el marcado, hibridación y lectura, se procedió a obtener los valores de fluorescencia para cada uno de los genes contenidos en el microarreglo. Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se requiere del análisis de las imágenes (Figura 9).

En primer lugar se realizó la aplicación de un filtro para depurar la imagen de pequeñas imperfecciones o señales no deseadas que pudieran encontrarse entre las muestras. Posteriormente se generó una retícula en la que se definieron las áreas a cuantificar (Figura 9). Una vez definida la retícula, se determinó una zona de exclusión y el área para calcular la señal de fondo de la imagen (recuadro en la figura 9).



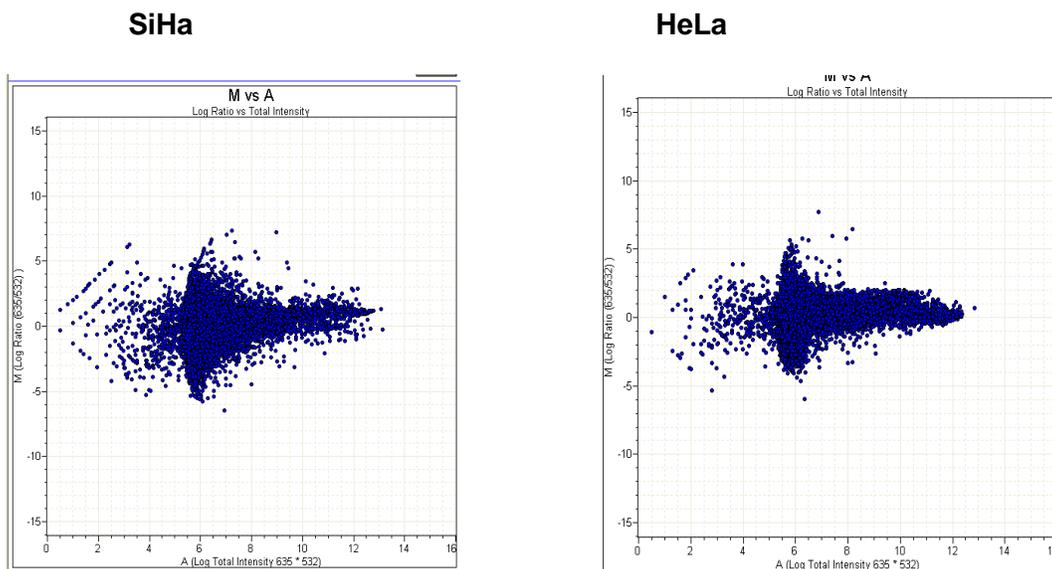
**Figura 9.** Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia del microarreglo, se requiere del análisis de las imágenes. Cuantificación de la señal de un microarreglo, definición y ajuste de la retícula. En el recuadro dentro del círculo amarillo, está la zona para obtener la densidad real, entre el círculo amarillo y el azul está la zona no considerada y entre el círculo azul y el rojo la zona para determinar la señal de fondo.

## VII. Normalización de los Datos

Antes de identificar cambios en la expresión génica, se debe analizar los datos obtenidos después del procesamiento de la imagen. La normalización es el proceso necesario para poder comparar datos de canales distintos. Estos datos corresponden a las intensidades relativas para cada "spot", pero deben ser normalizados en ambos canales. La normalización se realiza para ajustar las diferencias que pudieran existir en la cantidad de RNA utilizado, en la eficiencia del marcaje, de la hibridación, de los lavados y de la detección para cada muestra. Estas diferencias deben ser eliminadas para poder realizar una comparación. Una estrategia para este fin es el uso de controles como los genes constitutivos, que teóricamente no van a ser diferencialmente expresados entre ambas muestras y por eso se asume que su radio promedio de expresión medido debe ser 1 ( $Cy3/Cy5=1$ ). El radio es la relación que hay entre los valores de intensidad de los dos canales para un mismo "spot". Para los genes constitutivos, se ajusta el radio a 1, permitiendo así una comparación más confiable, después se calcula el radio para

cada “spot”. Para considerar un gen como diferencialmente expresado se hace uso de métodos estadísticos. El más usado es una simple desviación estándar que determine un valor de corte que depende de cada investigador, el más reportado ha sido de 2 “veces” (two-fold) tanto en regulación alta como en baja.

Las imágenes fueron analizadas empleando el software Gene Pix Pro v5.0. Los valores de expresión fueron globalmente normalizados al valor de la mediana de expresión de todos los puntos en los arreglos. Se hizo un MA “plot”, el cual proporciona una visión general y rápida de la distribución de los datos. En muchos experimentos de microarreglos de expresión génica, la suposición general es que en la mayoría de los genes no se ve ningún cambio significativo en su expresión. Por lo tanto la mayoría de los puntos en el eje Y (M) se esperan en 0, ya que  $\log(1)$  es 0 (Figuras 10). En nuestros experimentos podemos observar ese comportamiento, por lo tanto sólo los genes altamente sobre o sub expresados serán candidatos para caracterizar a las poblaciones de CICC de las no enriquecidas.



**Figura 10.** MA plot muestra el comportamiento de los datos después de la normalización de HeLa (derecha) y SiHa (izquierda). Se observa que la mayoría de los puntos están en el cero en el eje de las Y, lo cual es un patrón normal de los datos en ambos experimentos.

## VIII. Análisis Bioinformático

Una vez que los valores de expresión estuvieron normalizados, se obtuvieron las tasas de expresión. En este caso utilizamos la mediana de expresión para cada gen. A partir de los valores de densidad y fondo obtenidos de la lectura, se obtuvo el cociente entre la densidad y el fondo respectivamente. Estos valores nos permiten ver si los datos de señal que estamos obteniendo, son significativos. Para lograr una mayor simetría en la distribución, se obtuvieron los logaritmos en base 2 de las tasas de expresión para visualizar aumento o disminución en los niveles de expresión de un determinado transcrito. De esta forma se identificó aquellos genes que aumentaron o disminuyeron su expresión, así como aquellos que no cambiaron.

Para garantizar que un gen aumentó o disminuyó su expresión, se debe tomar en cuenta que la relación de la densidad entre el fondo sea significativa y que el valor de logaritmo base 2 sea mayor a 1 unidad para los genes que aumentaron su expresión y menor a  $-1$  unidad para los que disminuyeron.

De esta manera, la representación gráfica permite observar sobre-expresión (rojo) o sub-expresión (verde) de un gen determinado. La expresión esperada es de 10 000 genes en promedio a partir de un total de 40 000 secuencias de genes que tiene el microarreglo.

El porcentaje de expresión total de SiHa es de 40.3% de genes con un valor positivo y 59.7% con un valor negativo, para HeLa de 59.08% y 40.91%, respectivamente (Figura 11).

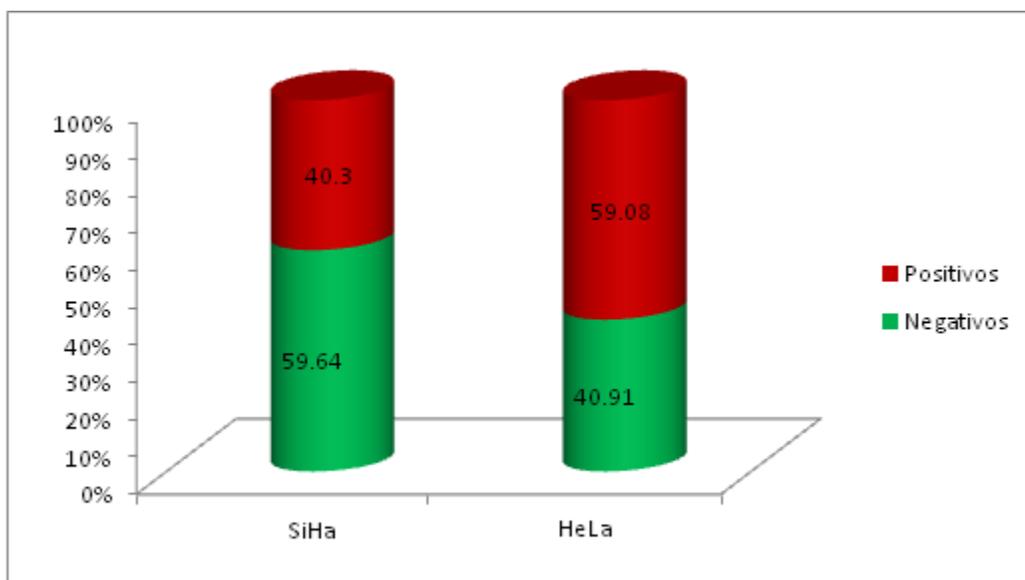


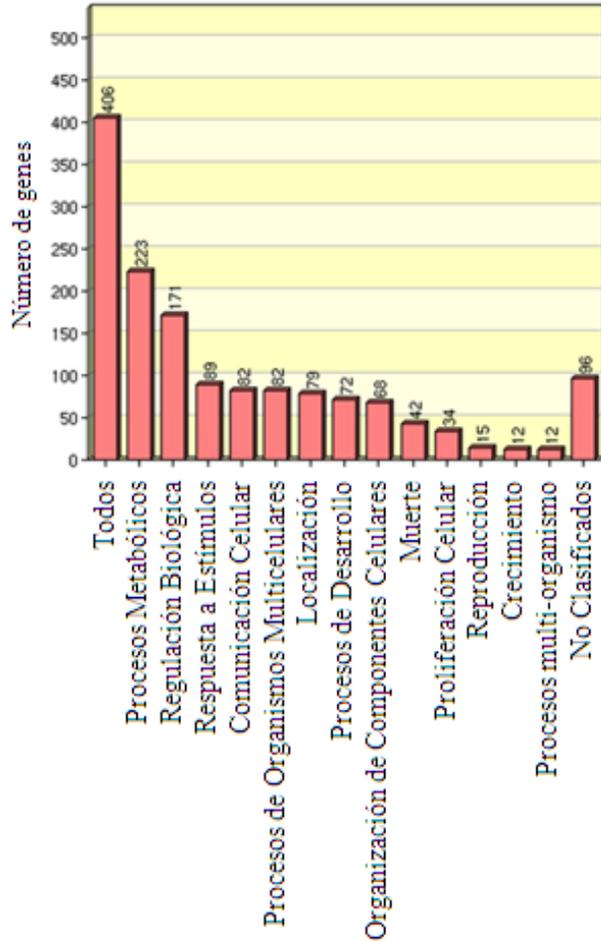
Figura 11. Porcentajes de expresión de SiHa y HeLa.

El enfoque de este trabajo se centra en el análisis del perfil de expresión genético en las poblaciones enriquecidas con células iniciadoras de cáncer de las líneas celulares SiHa y HeLa mediante el uso de microarreglos de cDNA. Como resultado el análisis mostró que en el caso de SiHa 349 genes tuvieron más de 2 veces la tasa de cambio en la expresión y 515 para HeLa.

A continuación se muestra una serie de figuras donde mediante el agrupamiento funcional de los genes diferencialmente expresados, una gran proporción de ellos fueron clasificados de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados. Cada barra representa un proceso biológico y la altura de la misma indica el número de genes observados en cada categoría de acuerdo a la lista de genes totales introducida en el software libre de la Universidad de Vanderbilt, el cual utiliza una la base de datos del GO (Gene Ontology) para hacer dicha clasificación (Figuras 12-15).

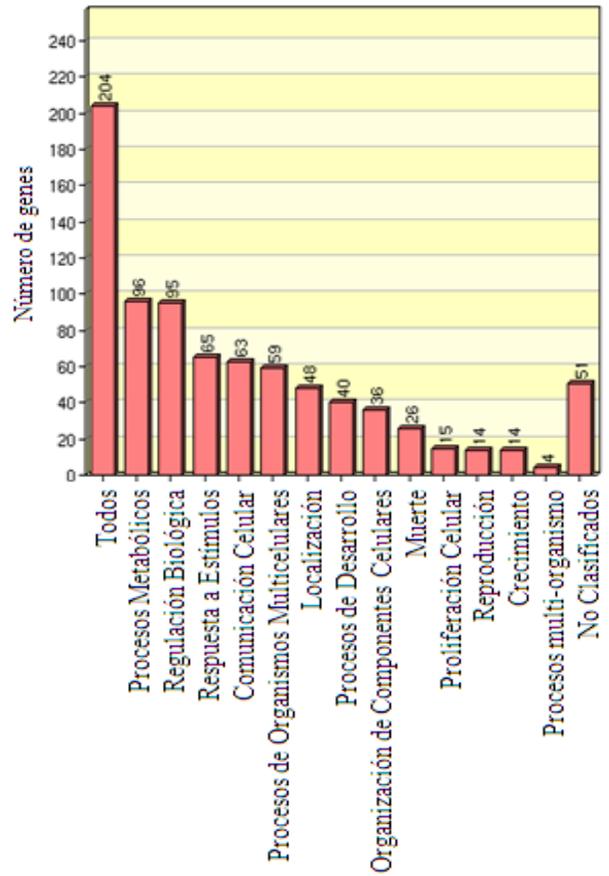
### HeLa Sobre expresados

**Figura 12.** Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sobre expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de HeLa.



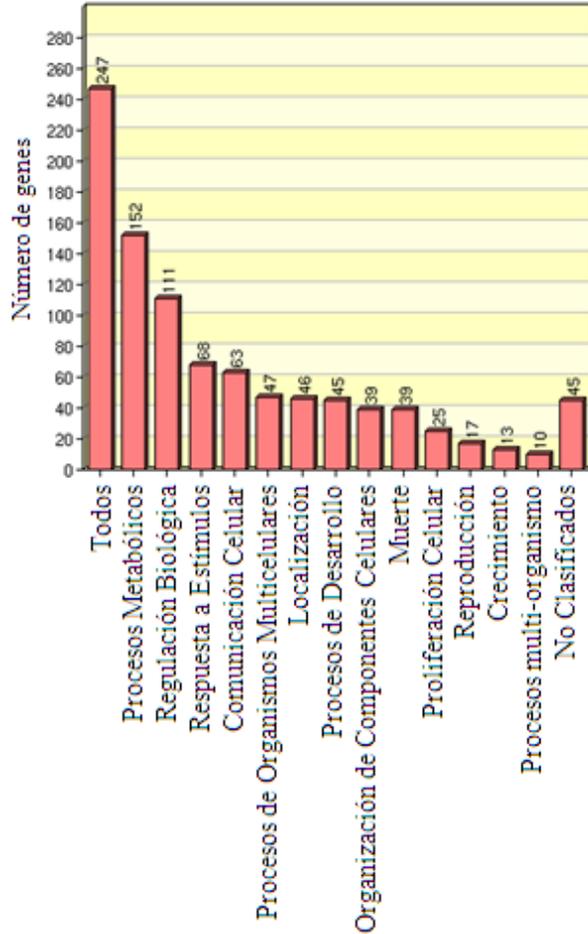
### HeLa Sub expresados

**Figura 13.** Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sub expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de HeLa.



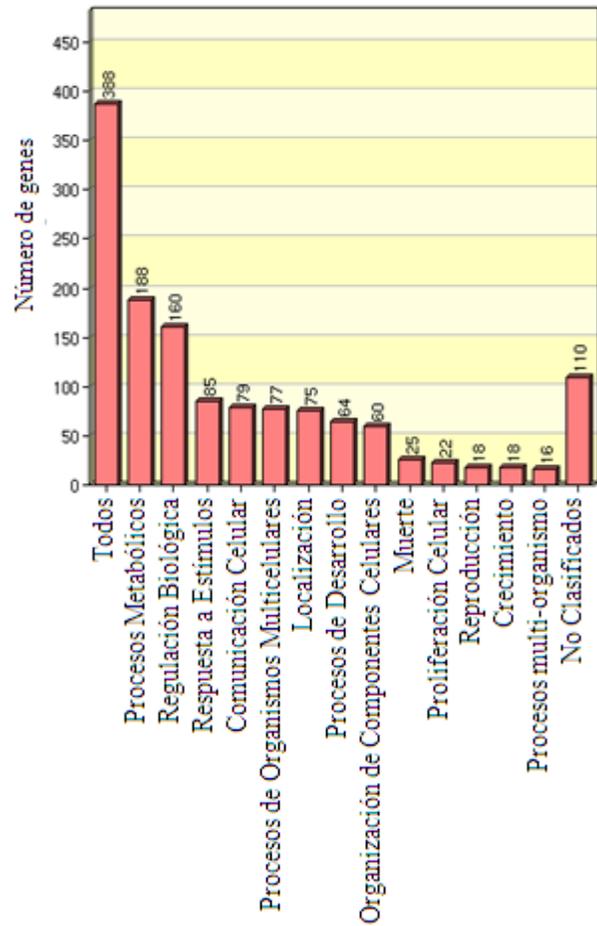
### SiHa Sobre expresados

**Figura 14.** Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sobre expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de SiHa.



### SiHa Sub expresados

**Figura 15.** Clasificación de acuerdo al proceso biológico en el que están involucrados los genes sub expresados en poblaciones enriquecidas con CICC de SiHa.



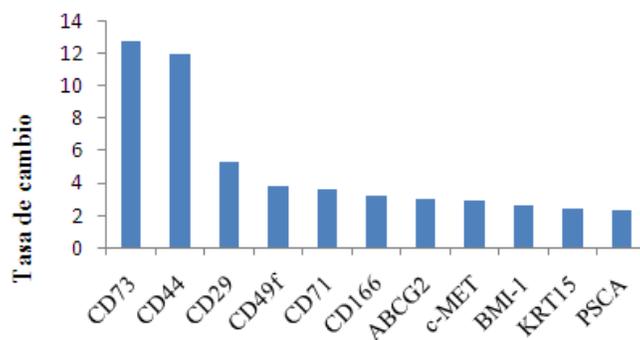
## **Marcadores de Células Troncales**

Dentro de las poblaciones enriquecidas con células troncales de CaCU se identificaron cambios en la expresión de una serie de marcadores moleculares que han sido previamente asociadas con el fenotipo de una célula troncal. Tal es el caso de CD73 y CD105 presente en placenta y células mesenquimales de médula ósea (Zhang, Li et al. 2004), CD44 en pulmón (Leung, Fiscus et al.; Shimada, Ishii et al. 2009), mama (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), cabeza y cuello (Chen, Chen et al.; Prince, Sivanandan et al. 2007), hígado (Zhu, Hao et al.), colon (Haraguchi, Ohkuma et al. 2008), próstata (Patrawala, Calhoun et al. 2006) y vejiga (Yang and Chang 2008). CD29 en cáncer de próstata (Duhagon, Hurt et al.; Rentala, Yalavarthy et al.) y células troncales epidermales (Webb, Li et al. 2004) CD49f en adenocarcinomas colorectales (Fan, Dong et al.), tejido de próstata (Barclay, Axanova et al. 2008) y células troncales de epidermis (Webb, Li et al. 2004; Terunuma, Kapoor et al. 2007), CD71 en keratinocitos de piel (Webb, Li et al. 2004); CD166 en cáncer de colon (Levin, Powell et al.; Dalerba, Dylla et al. 2007); SMA en células troncales derivadas de tejido adiposo (Lin, Xin et al.); ABCG2 en líneas celulares de ovario (Dou, Jiang et al.; Ma, Lai et al.); c-MET en cáncer de próstata (Guzman-Ramirez, Voller et al. 2009); CD9 en células neurales progenitoras (Klassen, Schwartz et al. 2001), PSCA (Prostate Stem Cell Antigen, por sus siglas en inglés) en cáncer de próstata (Guzman-Ramirez, Voller et al. 2009), KRT15 en cáncer de próstata (Duhagon, Hurt et al.) y keratinocitos de piel (Webb, Li et al. 2004); Bmi-1 en cáncer de próstata (Guzman-Ramirez, Voller et al. 2009).

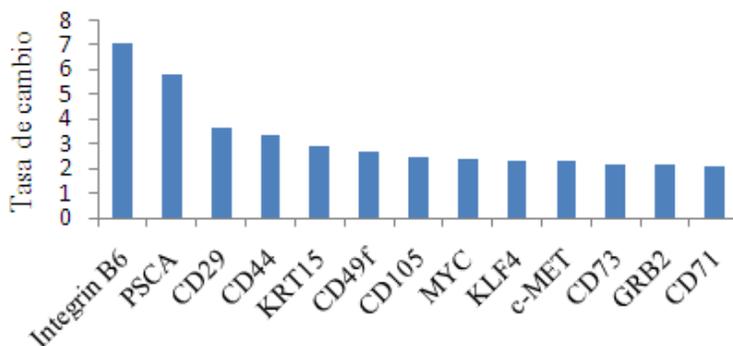
Por otra parte, en las poblaciones enriquecidas con células iniciadoras de tumor se detectó la sobreexpresión de marcadores de células troncales del tracto reproductor femenino. Entre los marcadores encontrados están CD44 (receptor del hyaluronato (Zhang, Balch et al. 2008; Alvero, Chen et al. 2009; Feng, Peng et al. 2009; Gargett, Schwab et al. 2009; Rutella, Bonanno et al. 2009)), la integrina beta-1 (CD29 (Sun, Cai et al.; Dimitrov, Timeva et al. 2008; Gargett, Schwab et al. 2009), PSCA (Liu, Jiang et al.; Liu, Jiang et al.), CD73 (NT5E) (Schuring, Schulte et al.; Dimitrov, Timeva et al. 2008; Gargett, Schwab et al. 2009), CD105 (Schuring, Schulte et al.; Sun, Cai et al.; Gargett, Schwab et al. 2009), nucleostamina (Ye, Zhou et al. 2008), c-MYC (Feng, Peng et al. 2009), BMI-1 (Zhang, Balch et al. 2008; Hubbard, Friel et al. 2009), ABCG2 (BCRP1-breast cancer resistance protein-1, por sus siglas en inglés (Szotek, Pieretti-Vanmarcke et al. 2006; Ono, Maruyama et al. 2007; Zhang, Balch et al. 2008; Gao, Geng et al. 2009) y CD34 (Schuring, Schulte et al.; Sun, Cai et al.; Dimitrov, Timeva et al. 2008; Feng, Peng et al. 2009; Gargett, Schwab et al. 2009). Otros marcadores troncales epiteliales que se encontraron fueron la integrina beta-6 (Dang and Ramos 2009), CD166 (ALCAM (Levin,

Powell et al.; Dalerba, Dylla et al. 2007), c-MET (Guzman-Ramirez, Voller et al. 2009), CD71 (Webb, Li et al. 2004) y citoqueratina 15 (Duhagon, Hurt et al.; Webb, Li et al. 2004).

La expresión de CD24 disminuyó en las células iniciadoras de cáncer de SiHa y HeLa, ambos marcadores CD44 y CD49f se expresan de forma selectiva en células troncales normales y en células iniciadoras cáncer de mama y otros tejidos. De forma consistente con esto, CD44 se une a varios receptores de tirosina cinasa, por ejemplo el factor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor c-MET y CD49f para estimular la transducción de señales (Figura 16 y 17) (Boccaccio and Comoglio 2006; Finkbeiner, Astanehe et al. 2009).



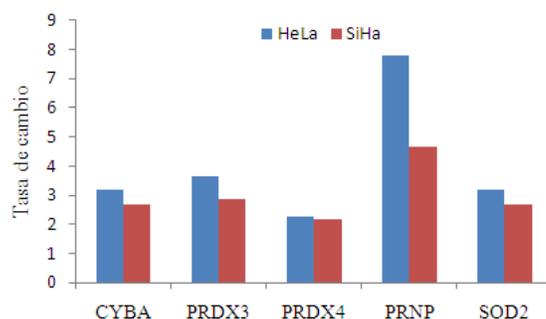
**Figura 16.** Marcadores de células troncales sobre expresados en la línea celular HeLa



**Figura 17.** Marcadores de células troncales sobre expresados en la línea celular SiHa

## Genes Involucrados con Especies Reactivas de Oxígeno

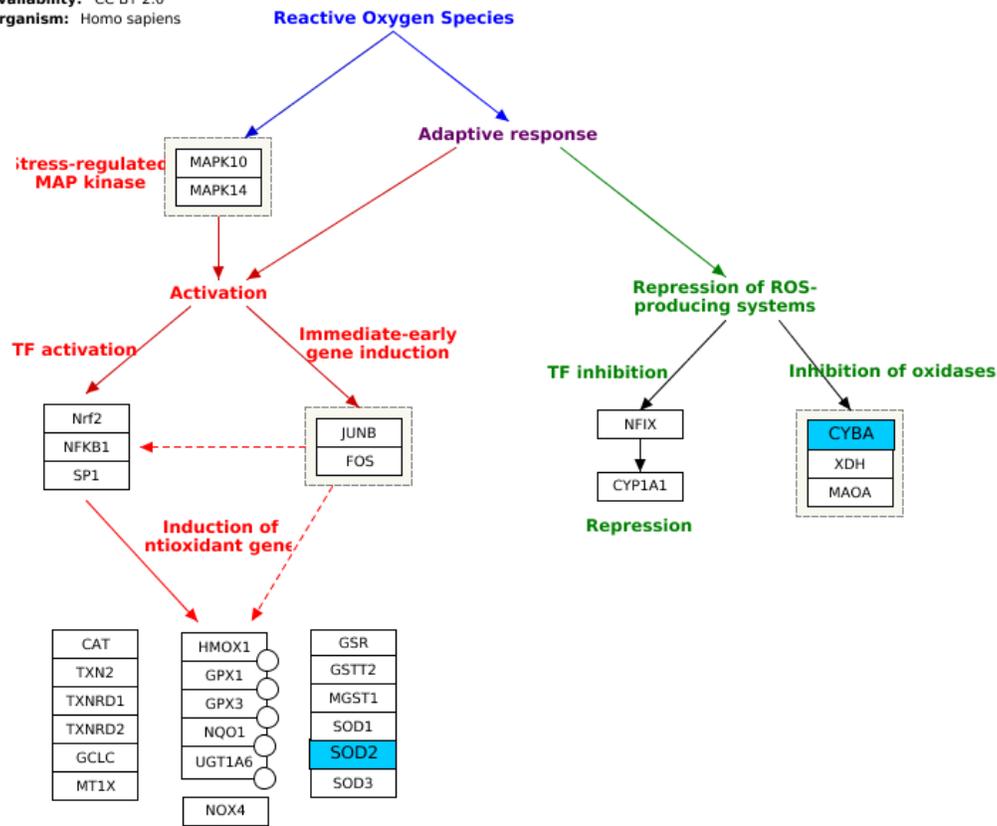
Por otra parte, se identificaron genes involucrados con la producción de especies reactivas de oxígeno y dentro de éstos se encuentran CYBA (citocromo B-245 polipetido alfa) involucrado en la producción de NADPH y la degradación de peróxido de hidrógeno, PRDX3 (Peroxiredoxina 3) reduce el peróxido de hidrógeno y los alquil hidroperóxidos a alcohol y agua. PRDX4 (Peroxiredoxina 4) que modula los niveles de peróxido intracelular como proteína cooperadora, posiblemente debido a la inhibición de la reacción de Fenton. PRNP cuando está presente promueve la actividad de SOD, aumenta la eliminación de aniones de superóxido. SOD2 (superóxido dismutasa 2) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrogeno (Figura 18).



**Figura 18.** Genes involucrados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno cuya expresión se encuentra sobre expresada.

La figura 19 muestra la vía de estrés oxidativo celular, en azul se señalan 2 genes sobre expresados en los microarreglos de ambas líneas celulares CYABA y SOD2. CYBA está involucrado en la represión de sistemas que producen especies reactivas de oxígeno al inhibir oxidasas, mientras que SOD2 induce la expresión de genes antioxidantes.

Title: Oxidative Stress  
 Availability: CC BY 2.0  
 Organism: Homo sapiens



**Figura 19.** Vía de estrés oxidativo celular, en azul se señalan 2 genes sobre expresados en los microarreglos de ambas líneas celulares CYABA y SOD2.

## Genes Involucrados con la Reparación del Daño al DNA

Asimismo, se seleccionó otro grupo de genes que están involucrados con la reparación de los daños en el DNA. Dentro de este grupo se encuentra XRCC5 y XRCC6 relacionados con la reparación no homóloga de los sitios finales del DNA, en el mismo grupo se encuentran XRCC4 que es un factor accesorio de las ligasas y XRCC2 que repara las rupturas y entrecruzamiento erróneo del DNA.

La recombinación homóloga es otro mecanismo de reparación del DNA dañado y algunos de los genes que incrementaron su expresión fueron RAD 51, RAD51L3, RAD21, RAD54B, RBBP8 y SHFM1. Otros genes de reparación son MSH5, MSH3 Y MSH2. La reparación de daño a DNA por escisión de nucleótidos (NER) incluye a RAD23B, RAD23A, RPA3, RPA2 y la reparación por escisión de bases (BER) están NEIL3, TDG, SMUG1.

El análisis de enriquecimiento para categorías en el Gene Ontology se visualiza en un DAG, (Directed Acyclic Graph, por sus siglas en inglés) para mantener la relación entre las categorías de GO enriquecidas.

La figura 20 muestra en rojo la ubicación de los genes sobre expresados en las categorías de procesos biológicos y función molecular del GO. Se observa que la mayoría de los genes están involucrados en la respuesta a estímulos, la respuesta a estrés y al daño del DNA, entre otros.



## Transición Epitelial Mesenquimal

La transición epitelial mesenquimal (TEM) es un proceso vital morfogenético que ocurre durante el desarrollo embrionario, sin embargo, recientemente se ha visto implicado en la alteración del tejido tumoral durante las etapas tempranas de la metástasis (Thiery 2002). La mayoría de los carcinomas que se encuentran en camino hacia la metástasis, están asociados con la pérdida de la diferenciación epitelial y por el cambio hacia el fenotipo mesenquimal, el cual está acompañado por un incremento en la motilidad celular y la invasión (Baum, Settleman et al. 2008; Turley, Veiseh et al. 2008). Estudios recientes han demostrado que la TEM juega un papel crítico no sólo en la metástasis del tumor sino también en su recurrencia, suceso que se supone está estrechamente vinculado con la biología de las células iniciadoras de cáncer (Mani, Guo et al. 2008; Santisteban, Reiman et al. 2009).

Recientemente, se ha reportado que la inducción de la TEM en células epiteliales de mama promueven la adquisición del fenotipo troncal CD44+/CD24-. En nuestro estudio, algunos marcadores asociados a la TEM fueron sobre expresados; para el caso de HeLa (GNG11, ITGA5, ITGAV, SERPINE1, TIMP1, TMEFF1 and VIM) y para SiHa (IGFBP4, SERPINE1, STEAP1 and TIMP1) (Figura 21). Adicionalmente, TEM está caracterizada por un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales, lo cual sugiere/proporciona evidencia de que los miofibroblastos puede derivar de células epiteliales (tumorales) vía TEM (Petersen, Nielsen et al. 2003; Radisky, Kenny et al. 2007). Esta idea está basada en la observación de esferoides compactos formados por células de cáncer de ovario en ascitis con capacidad contráctil, conteniendo alta capacidad invasiva in vitro y la expresión de SMA $\alpha$  y vimentina (Sodek, Ringette et al. 2009). Nuestros esferoides de HeLa y SiHa también sobre expresaron los marcadores vimentina y SMA $\alpha$ , indicando que una TEM ocurrió durante la progresión del cáncer de las células iniciadoras del cáncer de cérvix (Kato, Takao et al.). Se ha especulado también que la TEM involucra células en un estado híbrido, por ejemplo células con características de epitelio y de células mesenquimales (Thiery and Huang 2005).



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de una plataforma de expresión, la cual teóricamente presenta todos los posibles genes en el genoma humano; nos permitió identificar la mayoría de los genes diferencialmente expresados en poblaciones celulares enriquecidas con CICC respecto a poblaciones no enriquecidas.

Algunos de estos genes se han reportado como típicamente involucrados en el proceso de carcinogénesis de manera general ó en CaCU. Ejemplos de estos genes son *c-myc*, *ras*, *fos*, *NF-kappaB*, *EGFR*, *beta-catenina*, etc (Xu, Richert et al. 1984; Ocadiz, Saucedo et al. 1987; Agnantis, Spandidos et al. 1988; Cheung, Leung et al. 1997; Nair, Venkatraman et al. 2003). Estas evidencias muestran la importancia de emplear herramientas de análisis de alto rendimiento, pues en un solo experimento se analiza un gran número de genes. Los resultados producidos al coincidir con trabajos previos, validan no sólo los genes coincidentes con la literatura, sino el grupo de genes identificados por el empleo de herramientas de alto rendimiento, en este caso microarreglos de expresión.

A fin de encontrar un sentido biológico a los genes obtenidos, empleamos una herramienta capaz de producir una imagen de las poblaciones enriquecidas con CICC basada en las vías metabólicas descritas por KEGG (Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas, por sus siglas en inglés). La base de datos de KEGG presenta redes de proteínas anotadas por evidencias biológicas directas; es decir, todos los datos encontrados empleando esta herramienta tienen sustento en una gran cantidad de artículos científicos en donde se ha estudiado cada vía específica (Kanehisa, Goto et al. 2004).

*El que tiene mucha alegría debe ser un hombre bueno; pero quizá no el más inteligente, aunque alcance los fines a que aspira el más inteligente con toda su inteligencia.*

*Humano, demasiado humano.*

## CONCLUSIÓN

La importancia del presente trabajo radica en la caracterización de genes regulados de forma diferencial en poblaciones celulares enriquecidas con CICC. Este tipo de cáncer ocasionó 4,031 defunciones con una tasa de 7.4 por 100 000 mujeres en el 2008, con esto se estima que en ese año, murieron 11 mujeres por día.

De esta manera, el presente trabajo contribuye al conocimiento de las alteraciones en cuanto al perfil de expresión de poblaciones celulares enriquecidas con CICC. Esta caracterización fue posible gracias al uso de la metodología de microarreglos, la cual permitió realizar un análisis preliminar completo de los genes expresados en dichas poblaciones.

Este tipo de estudios no sólo nos permite comprender las vías de regulación en los procesos involucrados en la tumorigénesis, sino también identificar nuevos marcadores de pronóstico y diagnóstico.

La identificación de diferencias en poblaciones celulares enriquecidas en CICC y su contraparte no troncal a nivel molecular, abre importantes expectativas en cuanto a los mecanismos que propician el desarrollo del cáncer. Identificar estos actores específicos a cada enfermedad no sólo nos permitirá tener las herramientas necesarias para pronosticar y diagnosticar eficientemente, sino que por otra parte podremos comprender mejor el fenómeno analizado a una mayor resolución que hace algunos años.

*Llamamos buena o mala a una cosa en relación con nosotros, no con la cosa misma.  
Filosofía general.*

## **PERSPECTIVAS**

Este proyecto se enfocó en realizar una descripción a nivel transcripcional de las poblaciones enriquecidas con CICC, sin embargo la información derivada de este trabajo es vasta por tal razón se ha propuesto realizar estudios de proteómica a fin de identificar y caracterizar marcadores moleculares a nivel traduccional en alguna vía metabólica en particular.

*Hay una inocencia en la admiración.  
Y es la del hombre que no contempla  
la posibilidad de que él también podrá  
ser admirado algún día.*

*F. Nietzsche*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnantis, N. J., D. A. Spandidos, et al. (1988). "Immunohistochemical study of ras oncogene expression in endometrial and cervical human lesions." Eur J Gynaecol Oncol **9**(5): 360-5.
- Al-Hajj, M. and M. F. Clarke (2004). "Self-renewal and solid tumor stem cells." Oncogene **23**(43): 7274-82.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Alvero, A. B., R. Chen, et al. (2009). "Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance." Cell Cycle **8**(1): 158-66.
- Bapat, S. A., A. M. Mali, et al. (2005). "Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer." Cancer Res **65**(8): 3025-9.
- Barclay, W. W., L. S. Axanova, et al. (2008). "Characterization of adult prostatic progenitor/stem cells exhibiting self-renewal and multilineage differentiation." Stem Cells **26**(3): 600-10.
- Baum, B., J. Settleman, et al. (2008). "Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease." Semin Cell Dev Biol **19**(3): 294-308.
- Bernard, H. U., S. Y. Chan, et al. (1994). "Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms." J Infect Dis **170**(5): 1077-85.
- Boccaccio, C. and P. M. Comoglio (2006). "Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells." Nat Rev Cancer **6**(8): 637-45.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-7.
- Bosch, F. X., A. Lorincz, et al. (2002). "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer." J Clin Pathol **55**(4): 244-65.
- Chen, Y. W., K. H. Chen, et al. "Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells." Mol Cancer Ther **9**(11): 2879-92.
- Cheung, T. H., J. O. Leung, et al. (1997). "c-fos overexpression is associated with the pathogenesis of invasive cervical cancer." Gynecol Obstet Invest **43**(3): 200-3.
- Clarke, M. F., J. E. Dick, et al. (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Res **66**(19): 9339-44.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-51.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." Annu Rev Med **58**: 267-84.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10158-63.
- Dang, D. and D. M. Ramos (2009). "Identification of  $\alpha\beta$ 6-positive stem cells in oral squamous cell carcinoma." Anticancer Res **29**(6): 2043-9.
- de Villiers, E. M. (1994). "Human pathogenic papillomavirus types: an update." Curr Top Microbiol Immunol **186**: 1-12.
- Dimitrov, R., T. Timeva, et al. (2008). "Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium." Reproduction **135**(4): 551-8.
- Dontu, G., W. M. Abdallah, et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." Genes Dev **17**(10): 1253-70.

- Dou, J., C. Jiang, et al. "Using ABCG2-molecule-expressing side population cells to identify cancer stem-like cells in a human ovarian cell line." Cell Biol Int **35**(3): 227-34.
- Duhagon, M. A., E. M. Hurt, et al. "Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres." BMC Genomics **11**: 324.
- Fan, L. F., W. G. Dong, et al. "Expression of putative stem cell genes Musashi-1 and beta1-integrin in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Int J Colorectal Dis **25**(1): 17-23.
- Feng, D., C. Peng, et al. (2009). "Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri." Oncol Rep **22**(5): 1129-34.
- Finkbeiner, M. R., A. Astanehe, et al. (2009). "Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells." Oncogene **28**(11): 1421-31.
- Galli, R., E. Binda, et al. (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res **64**(19): 7011-21.
- Gao, Q., L. Geng, et al. (2009). "Identification of cancer stem-like side population cells in ovarian cancer cell line OVCAR-3." Ultrastruct Pathol **33**(4): 175-81.
- Gargett, C. E., K. E. Schwab, et al. (2009). "Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium." Biol Reprod **80**(6): 1136-45.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.
- Guzman-Ramirez, N., M. Voller, et al. (2009). "In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue." Prostate **69**(15): 1683-93.
- Haraguchi, N., M. Ohkuma, et al. (2008). "CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells." Ann Surg Oncol **15**(10): 2927-33.
- Hemmati, H. D., I. Nakano, et al. (2003). "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15178-83.
- Hubbard, S. A., A. M. Friel, et al. (2009). "Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma." Cancer Res **69**(21): 8241-8.
- Informática, D. G. d. E. e. (2008). Estadísticas en Salud, mortalidad. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). S. d. Salud. México, D.F.
- Kanehisa, M., S. Goto, et al. (2004). "The KEGG resource for deciphering the genome." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D277-80.
- Kato, K., T. Takao, et al. "Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage." Am J Pathol **176**(1): 381-92.
- Kim, C. F., E. L. Jackson, et al. (2005). "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." Cell **121**(6): 823-35.
- Kitahara, O., T. Katagiri, et al. (2002). "Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis." Neoplasia **4**(4): 295-303.
- Klassen, H., M. R. Schwartz, et al. (2001). "Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes." Neurosci Lett **312**(3): 180-2.
- Leung, E. L., R. R. Fiscus, et al. "Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties." PLoS One **5**(11): e14062.
- Levin, T. G., A. E. Powell, et al. "Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract." Gastroenterology **139**(6): 2072-2082 e5.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**(3): 1030-7.
- Lin, C. S., Z. C. Xin, et al. "Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture." Histol Histopathol **25**(6): 807-15.

- Liu, W. K., X. Y. Jiang, et al. "Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens." Arch Virol **155**(5): 657-63.
- Liu, W. K., X. Y. Jiang, et al. "Expression of PSCA, PIWIL1, and TBX2 in endometrial adenocarcinoma." Onkologie **33**(5): 241-5.
- Lobo, N. A., Y. Shimono, et al. (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-99.
- Ma, L., D. Lai, et al. "Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **42**(9): 593-602.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-15.
- Marshall, G. P., 2nd, B. A. Reynolds, et al. (2007). "Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo." Curr Pharm Biotechnol **8**(3): 141-5.
- Matsukura, T., S. Koi, et al. (1989). "Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers." Virology **172**(1): 63-72.
- Munoz, N. (2000). "Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence." J Clin Virol **19**(1-2): 1-5.
- Nair, A., M. Venkatraman, et al. (2003). "NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix." Oncogene **22**(1): 50-8.
- Natarajan, T. G. and K. T. FitzGerald (2007). "Markers in normal and cancer stem cells." Cancer Biomark **3**(4-5): 211-31.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-10.
- Ocadiz, R., R. Saucedo, et al. (1987). "High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix." Cancer Res **47**(15): 4173-7.
- Ono, M., T. Maruyama, et al. (2007). "Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18700-5.
- Palefsky, J. M. and E. A. Holly (1995). "Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(4): 415-28.
- Park, T. W., H. Fujiwara, et al. (1995). "Molecular biology of cervical cancer and its precursors." Cancer **76**(10 Suppl): 1902-13.
- Patrawala, L., T. Calhoun, et al. (2006). "Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells." Oncogene **25**(12): 1696-708.
- Petersen, O. W., H. L. Nielsen, et al. (2003). "Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma." Am J Pathol **162**(2): 391-402.
- Piscaglia, A. C., T. Shupe, et al. (2007). "Microarray RNA/DNA in different stem cell lines." Curr Pharm Biotechnol **8**(3): 167-75.
- Prince, M. E., R. Sivanandan, et al. (2007). "Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 973-8.
- Quackenbush, J. (2001). "The power of public access: the human genome project and the scientific process." Nat Genet **29**(1): 4-6.
- Radisky, D. C., P. A. Kenny, et al. (2007). "Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?" J Cell Biochem **101**(4): 830-9.

- Rental, S., P. D. Yalavarthy, et al. "Alpha1 and beta1 integrins enhance the homing and differentiation of cultured prostate cancer stem cells." Asian J Androl **12**(4): 548-55.
- Reynolds, B. A. and R. L. Rietze (2005). "Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship." Nat Methods **2**(5): 333-6.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-5.
- Richardson, G. D., C. N. Robson, et al. (2004). "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3539-45.
- Rutella, S., G. Bonanno, et al. (2009). "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." Clin Cancer Res **15**(13): 4299-311.
- Santisteban, M., J. M. Reiman, et al. (2009). "Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells." Cancer Res **69**(7): 2887-95.
- Schiffman, M. H., H. M. Bauer, et al. (1993). "Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia." J Natl Cancer Inst **85**(12): 958-64.
- Schuring, A. N., N. Schulte, et al. "Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics." Fertil Steril **95**(1): 423-6.
- Shimada, Y., G. Ishii, et al. (2009). "Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung." Cancer Sci **100**(11): 2054-9.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-8.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Sodek, K. L., M. J. Ringuette, et al. (2009). "Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype." Int J Cancer **124**(9): 2060-70.
- Sun, X., H. Cai, et al. "Mesenchymal stem cells isolated from human uterine cervix cancer tissues." Cell Biol Int **35**(2): 119-23.
- Szotek, P. P., R. Pieretti-Vanmarcke, et al. (2006). "Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11154-9.
- Terunuma, A., V. Kapoor, et al. (2007). "Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay." Stem Cells **25**(3): 664-9.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P. and R. Huang (2005). "Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6." Dev Cell **8**(4): 456-8.
- Turek, L. P. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." Adv Virus Res **44**: 305-56.
- Turley, E. A., M. Veisoh, et al. (2008). "Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression?" Nat Clin Pract Oncol **5**(5): 280-90.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." Nat Rev Cancer **8**(10): 755-68.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-9.
- Webb, A., A. Li, et al. (2004). "Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin." Differentiation **72**(8): 387-95.
- Wong, Y. F., D. S. Sahota, et al. (2006). "Gene expression pattern associated with radiotherapy sensitivity in cervical cancer." Cancer J **12**(3): 189-93.

- Wong, Y. F., Z. E. Selvanayagam, et al. (2003). "Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray." Clin Cancer Res **9**(15): 5486-92.
- Xin, L., D. A. Lawson, et al. (2005). "The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 6942-7.
- Xu, Y. H., N. Richert, et al. (1984). "Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7308-12.
- Yang, Y. M. and J. W. Chang (2008). "Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells." Cancer Invest **26**(7): 725-33.
- Ye, F., C. Zhou, et al. (2008). "Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells." BMC Cancer **8**: 108.
- Yu, J., L. Zhang, et al. (1999). "Identification and classification of p53-regulated genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14517-22.
- Yuan, X., J. Curtin, et al. (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." Oncogene **23**(58): 9392-400.
- Zhang, S., C. Balch, et al. (2008). "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors." Cancer Res **68**(11): 4311-20.
- Zhang, Y., C. D. Li, et al. (2004). "Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow." Chin Med J (Engl) **117**(6): 882-7.
- Zhu, Z., X. Hao, et al. "Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma." Int J Cancer **126**(9): 2067-78.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F55-78.
- zur Hausen, H. (1999). "Papillomaviruses in human cancers." Proc Assoc Am Physicians **111**(6): 581-7.