



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO EN CÉLULAS
TRONCALES DE CÁNCER.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

LUCÍA PÉREZ SÁNCHEZ

TUTORA: Mtra. ISABEL MARTÍNEZ SANABRIA

ASESORA: Esp. DOLORES CARRASCO ORTIZ

MÉXICO, D.F.

2015



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.

A mis padres mi mayor orgullo, gracias por su infinito amor, confianza, paciencia y sacrificio por darme la oportunidad de estudiar, sin ustedes jamás lo hubiera logrado. Los amo con todo mi corazón.

A Paco, Mariana y Diego gracias por ser mi familia, por escucharme, apoyarme y brindarme su amor. Los amo.

A mis abuelitos mi ejemplo a seguir gracias por recorrer este camino conmigo por su amor y confianza.

A mis tíos, primos y demás familiares por acompañarme y confiar en mí.

A ti Dios por la vida, por la fortaleza, amor y compañía para seguir mi camino a pesar de las adversidades te siento a lado mío.

AGRADECIMIENTOS.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi desarrollo profesional, por la identidad, responsabilidad y orgullo de ser universitario.
- A mis maestros con todo el respeto y admiración por su noble labor diaria, por el conocimiento compartido, por dignificar nuestra profesión con sus acciones. Muchas gracias.
- En especial a mi tutora Mtra. Isabel Martínez Sanabria por su tiempo, compromiso, dedicación y valiosa aportación, sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este trabajo. Gracias por la confianza y el apoyo.
- A mi asesora Esp. Dolores Carrasco Ortiz por su tiempo, sus valiosas aportaciones y comentarios constructivos que ayudaron a mi trabajo.
- A la Mtra. Adriana Patricia Rodríguez por su tiempo, dedicación y compromiso sus valiosas aportaciones enriquecieron este trabajo.
- A la Dra. Tayra García Durán por su apoyo y confianza brindada. Gracias.
 - A mis amigos, no tengo palabras para expresar el agradecimiento y el cariño enorme que les tengo, por compartir y enseñarme el valor de la amistad, sin ustedes esta etapa de la vida no habría tenido sentido.

INDICE

A. Introducción	
I. Resumen	5
II. Justificación	6
III. Objetivos	7
1. Generales	
2. Específicos	
B. Contenido temático.	
I. Virus del Papiloma Humano (VPH)	
1. Estructura y genoma viral	8
2. Clasificación y tropismo	10
3. Ciclo viral y fisiopatología	14
4. Detección molecular	16
5. Oncogénesis viral	18
II. Células troncales del cáncer (CSC)	
1. Antecedentes	20
2. Definición	23
3. Características	26
3.1 Autorrenovación	26
3.2 Pluripotencialidad	27
3.3 Buena expresión de la telomerasa	28
3.4 Evasión de la apoptosis	28
3.5 Habilidad para migrar y generar metástasis	30
3.6 Resistencia al tratamiento	32
4. Biomarcadores de CSC	35
5. Modelo de esfera para el estudio de CSC	38
III. Virus del papiloma humano y células troncales del cáncer	42
1. CSC en carcinoma oral	42
2. CSC en carcinoma cervico-uterino	51
C. Discusión	55
D. Conclusiones	58
E. Referencias bibliográficas	59

Introducción.

I. Resumen.

El virus del papiloma humano (VPH) es considerado un virus oncogénico, relacionado principalmente con carcinoma de células escamosas en piel y mucosas, su oncogénesis viral se ha descrito ampliamente en la literatura, en donde se confirma la función de sus principales oncoproteínas (E6-E7) y su interacción con genes supresores de tumor (p53 y pRB). El mecanismo de p53 se activa cuando existe un daño celular en el DNA, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y enviando a la célula a apoptosis. La unión de E6 con p53 degrada al gen supresor de tumor, inactivando sus funciones. Por otra parte, el gen pRB se encarga de controlar la transición de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, deteniéndola si la célula lo requiere, a través de la unión de pRB con E2f (factor de transcripción). Sin embargo, la interacción de E7 con pRB, provoca la liberación de E2f permitiendo la continuación del ciclo celular. La sobreexpresión de E6-E7 da como consecuencia un crecimiento y proliferación celular descontrolada. Este conocimiento a dado pauta a nuevas investigaciones, en donde se argumenta en cáncer oral, que una de las vías de transformación a células troncales del cáncer (CSC) es debido a la infección por VPH, ya que ocurre una des-diferenciación en la célula infectada, además de sugerir que el virus no solo tiene tropismo por las células basales, sino que tiene una posible afinidad a las células madre del epitelio, siendo su infección la segunda vía de transformación a CSC. Las células expresan genes de troncalidad, y adquieren características especiales; de autorrenovación, pluripotencialidad, quimiorresistencia, radiorresistencia entre otras, además pueden sobreexpresar genes involucrados en el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. En el presente trabajo se documenta la posible relación de la infección por

VPH en CSC, a través de modelos de estudio en carcinoma oral y cervico-uterino.

II. Justificación

El perfil epidemiológico de los tumores malignos menciona, que la tercera causa de muerte, por enfermedad en nuestro país son las neoplasias malignas, en donde el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECYC) ocupa el sexto lugar y; el carcinoma cervico-uterino (CaCu) segundo lugar de muerte en mujeres a nivel mundial. Los factores asociados a carcinoma oral son el tabaco, el alcohol y la infección por VPH que representa aproximadamente, el 60% de los casos de cáncer oral, mientras que en CaCu se asocia el 99% con la infección viral. Se estudió la región oral y cervico-uterino debido a que ambas regiones son susceptibles a la infección y patogenia del VPH. Por otro lado, el aumento en la incidencia del carcinoma orofaríngeo se atribuye al incremento de casos de VPH positivos, posiblemente ocasionados por los patrones de conducta sexual, en la población en general. Además de que el pronóstico de esta neoplasia es desfavorable, ya que el 50% de los pacientes mueren por dicha enfermedad. Estos conocimientos dan pauta para realizar una revisión bibliográfica, sobre la importancia de la infección por VPH como factor etiológico, en el cáncer oral y cervico-uterino, además de la asociación de la infección vírica en células troncales del cáncer (CSC). Así mismo describir los modelos actuales en carcinoma oral y cervico-uterino que corroboren dicha interacción VPH-CSC y la progresión de la neoplasia.

III. Objetivos.

1. Objetivo general.

Conocer la importancia de la infección por VPH en las células troncales del cáncer a partir de modelos de estudio realizados en carcinoma bucal y cervico-uterino a través de una revisión de artículos científicos y bibliográficos.

2. Objetivos Específicos.

- Mencionar las características generales del VPH, su estructura, genoma, clasificación, ciclo viral, fisiopatología, oncogénesis y detección molecular, para comprender su mecanismo de patogenicidad.
- Determinar antecedentes, definición y características de las células troncales del cáncer para identificar su potencial oncogénico.
- Identificar los biomarcadores de las CSC y los biomarcadores relacionados a la infección de VPH, así como conocer el modelo de esfera para el estudio de las CSC.
- Describir la relación de las CSC en el carcinoma oral y explicar la infección de VPH de CSC en CaCu, debido a la alta incidencia y pronóstico desfavorable de ambas neoplasias.

B. Contenido temático.

I. Virus del Papiloma Humano (VPH).

1. Estructura y genoma viral.

El VPH es un virus desnudo de DNA de doble cadena de aproximadamente 8Kb, circular con cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, producidos por dos proteínas estructurales de un diámetro entre 50 y 55nm que contiene un promedio de ocho genes, divididos en tres regiones⁽¹⁾. La primera es una larga región de control (LCR, de sus siglas en inglés long control región), la cual tiene la función reguladora de la transcripción de los genes virales E6 y E7, la segunda es una región temprana (E, de sus siglas en inglés early) que corresponden a los genes (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) los que codifican para proteínas no estructurales implicadas en la replicación y en la oncogénesis, la tercera es la región tardía (L de sus siglas en inglés late) la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2⁽²⁾. Véase figura 1 y tabla 1.

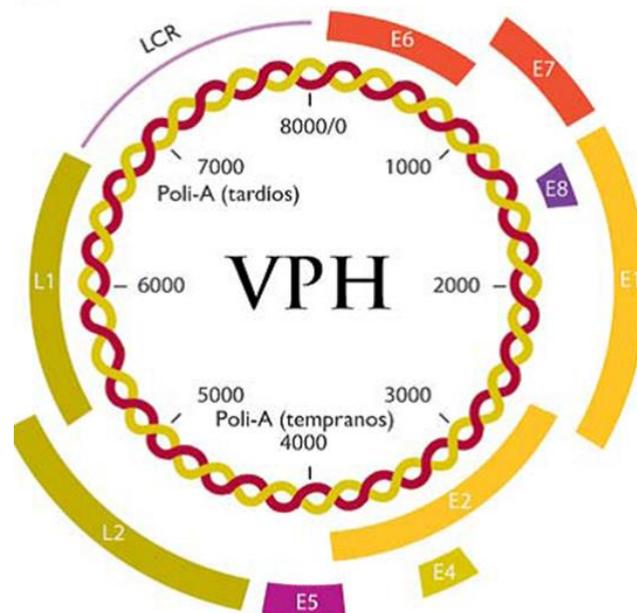


Fig. 1. Genoma viral.

Virus desnudo de DNA con doble cadena de aproximadamente 8Kb, circular. Imagen de Félix Beltrán *et al*⁽²⁾.

Tabla 1. Función de los genes de VPH.⁽³⁾	
Oncogenes.	Funciones principales
E1.	Replicación del DNA viral utilizando la maquinaria replicativa de la célula huésped.
E2.	Actúa como represor de la transcripción de los genes E6 y E7. Se encuentra involucrada en la transcripción y replicación viral.
E3.	Se desconoce.
E4.	E4 se expresa con E1 y E2 Precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales.
E5.	Regula la actividad de los receptores de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el derivado de plaquetas (PDGFR). Basado con interacciones con otras proteínas conducen a alteraciones en la actividad biológica normal y evasión de la respuesta inmune.
E6.	Induce la degradación de p53 a través de la vía proteosoma-ubiquitina.
E7.	Degradación proteosomal y fosforilación de pRB con la liberación de E2F y la activación de los genes promotores de la proliferación celular.
E8-E2.	Desempeña un papel importante en la replicación viral.
L1.	Principal proteína estructural de la cápside, debido a su participación en la entrada del virus a la célula hospedera y además induce una respuesta inmune protectora.
L2.	Componente secundario de la cápside Participa en el proceso de encapsidación y en el proceso de adhesión celular como un ligando secundario.

Tabla 1. Función de los genes del VPH. Genes estructurales (E1-E8) codifican proteínas no estructurales y; genes tardíos (L1 y L2) codifican proteínas estructurales. Tabla de Bernard *et al*⁽³⁾.

2. Clasificación y tropismo.

Los *Papillomavirus* comprenden un grupo diverso de virus que infectan a los seres humanos y animales. Su origen está vinculado a los cambios en el epitelio, a la evolución de los recursos o atributos de huésped, así como la presencia o ausencia de piel o la evolución de glándulas sudoríparas⁽²⁾. Anteriormente los *Papillomavirus* pertenecían junto con los *Poliomavirus*, a la familia *Papoviridae*; sin embargo, con la posterior secuenciación de los genomas de los papilomavirus se observó que aunque tienen una organización genética semejante, su transcripción es diferente, por lo que el comité internacional de taxonomía de los virus decidió que los *Papillomavirus* fueran una familia diferente, denominada *Papillomaviridae*. Esta familia infecta los epitelios de mamíferos y otras especies vertebradas. El VPH pertenece a cinco de 18 géneros de la familia *Papillomaviridae*: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* y *Nu-papillomavirus*⁽³⁾ de los cuales solo *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus* y *Gamma-papillomavirus* infectan humanos⁽⁴⁾. Dentro del grupo de los *Alpha-papillomavirus* se encuentran los VPH llamados de alto riesgo y bajo riesgo. Véase figura 2.

La clasificación del VPH se basa en la secuencia de nucleótidos del gen L1⁽⁵⁾, para ser diferenciados como tipos distintos de virus deben ser al menos 10% divergentes entre sí en su secuencia de nucleótidos, las propiedades de esta proteína permite que el virus sea tratado como VPH-AR (alto riesgo) o VPH-BR (bajo riesgo) y por lo tanto, su genotipo específico se utiliza para clasificar estos virus⁽⁶⁾.

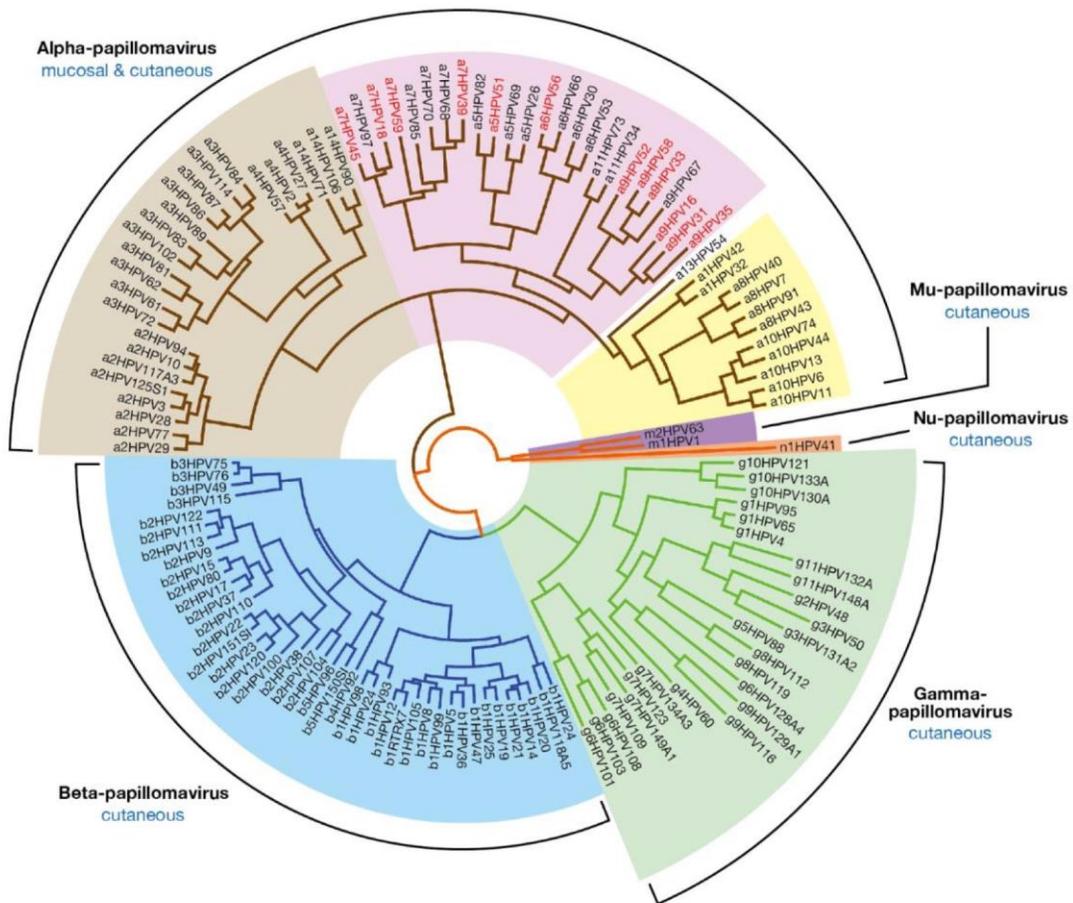


Fig. 2. Relación filogenética de *Papillomavirus* y la representación de subespecies de VPH. VPH: De bajo riesgo con tropismo cutáneo (café claro); de bajo riesgo con tropismo mucoso (amarillo) y de alto riesgo (rosa). Se encuentran destacadas de color rojo las especies con alto índice de oncogénesis en humanos, confirmados por los datos epidemiológicos ⁽¹⁾. Imagen de Egawa *et al*⁽¹⁾.

Actualmente se han descrito más de 200 tipos de VPH, los cuales tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados, infectando piel, mucosa oral y/o del tracto ano-genital. Los tipos de VPH cutáneos, entre ellos los tipos 1, 2, 3, 7 y 10 tienen como blanco principal manos y pies, formando verrugas típicas de la infección. Los VPH que tienen preferencia por tejidos mucosos infectan boca, garganta, tracto respiratorio o epitelio ano-genital y en cualquiera de ellos podría dar origen a un proceso carcinogénico⁽³⁾.

Los VPH transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40, el subgrupo conocido como de alto riesgo que incluye cerca de 13 tipos de virus son los tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73. De los cuales los VPH 16 y 18 son los más importantes debido a que representan el 70% de los casos de cáncer cervico-uterino (CCU)⁽⁷⁾. Los VPH de bajo riesgo son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81⁽⁵⁾, los cuales se asocian con el condiloma acuminado, lesiones intraepiteliales escamosa de bajo grado (LIEBG) y las infecciones asintomáticas^(4, 8, 9).

Su clasificación de acuerdo al tropismo tisular y las diferentes manifestaciones clínicas del VPH: cutáneo, mucoso y el grupo de la epidermodisplasia verruciforme, se describen en la tabla 2⁽⁶⁾.

Silva *et al.* estiman que la tasa de infección del VPH varía entre 1.4 y 25.6% de la población en general, dependiendo de la región, pero las tasas más altas se encuentran en África Sub-sahara y Sudamérica. También es notoria la frecuencia del tipo viral 16, que es prevalente en todo el mundo, además es evidente que a mayor edad disminuye la prevalencia de infección por VPH debido al clearance o “limpieza” que realiza el sistema inmune, eliminando sistemáticamente los tipos virales así como las células infectadas⁽³⁾.

Tabla 2. Enfermedades causadas por VPH.		
Grupo clínico-patológico.	Tipos virales.	Lesión producida.
Grupo cutáneo.	1, 4.	Verrugas plantares.
	2, 26, 28, 29, 38, 49, 57, 60, 63, 65.	Verrugas vulgares.
	3, 10, 27.	Verruga plana.
	7.	Condiloma de Buchet.
Grupo de la epidermodisplasia verruciforme.	5 y 8.* 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 37, 46-50.	Lesiones maculares.
Grupo mucosotrópico.	13, 32.	Hiperplasia focal localizada.
	6, 11.	LIEBG, condiloma acuminado, papilomas laríngeos y conjuntival
	42-44, 53-55, 63, 66.	Principalmente LIEBG
	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67.	LIEBG, LIEAG, carcinoma escamoso invasor.
	18, 39, 45, 59, 68.	LIEBG, LIEAG, carcinoma escamoso y glandular.

Tabla 2. Enfermedades causadas por VPH.

*Tipos virales asociados a epidermodisplasias verruciformes con progresión a carcinoma.

LIEBG-Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

LIEAG-Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

Tabla de De la Fuente *et al*⁽⁶⁾.

3. Ciclo viral y fisiopatología.

El primer paso en una infección por VPH, es la adhesión de viriones intactos a células de un epitelio escamoso, del cual pueden ocurrir dos tipos de infección: productivas o latentes⁽⁶⁾. En las infecciones productivas o líticas, el ciclo viral de VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula huésped infectada, el queratinocito⁽⁸⁾. Actualmente se sabe que el virión de VPH infecta al epitelio por microabrasiones, el cual se asocia con receptores como alfa integrina y heparán sulfato⁽⁴⁾ el virus entra a la célula basal a través de endocitosis, en este punto el genoma es transportado al núcleo en donde coloniza, con un número de copias entre 10-200 genomas virales extracromosómicos o episomales dentro de la células⁽⁸⁾. Los genes víricos, específicamente los de expresión temprana (E1-E8), estimulan la proliferación celular, por lo que facilitan la expresión del genoma vírico por la polimerasa de DNA de la célula hospedadora cuando las células se dividen, esto causa que el VPH incremente el número de células provocando el engrosamiento del estrato espinoso y basal, lo que da origen a verrugas, papilomas y condilomas.

Además los genes de expresión tardía (L1-L2) que codifican para proteínas estructurales, se expresan únicamente en la capa superior del epitelio donde se encuentran las células totalmente diferenciadas, el virus aprovecha la maduración celular y se desprenden sus viriones con las células muertas de la capa superior. Véase figura 3.

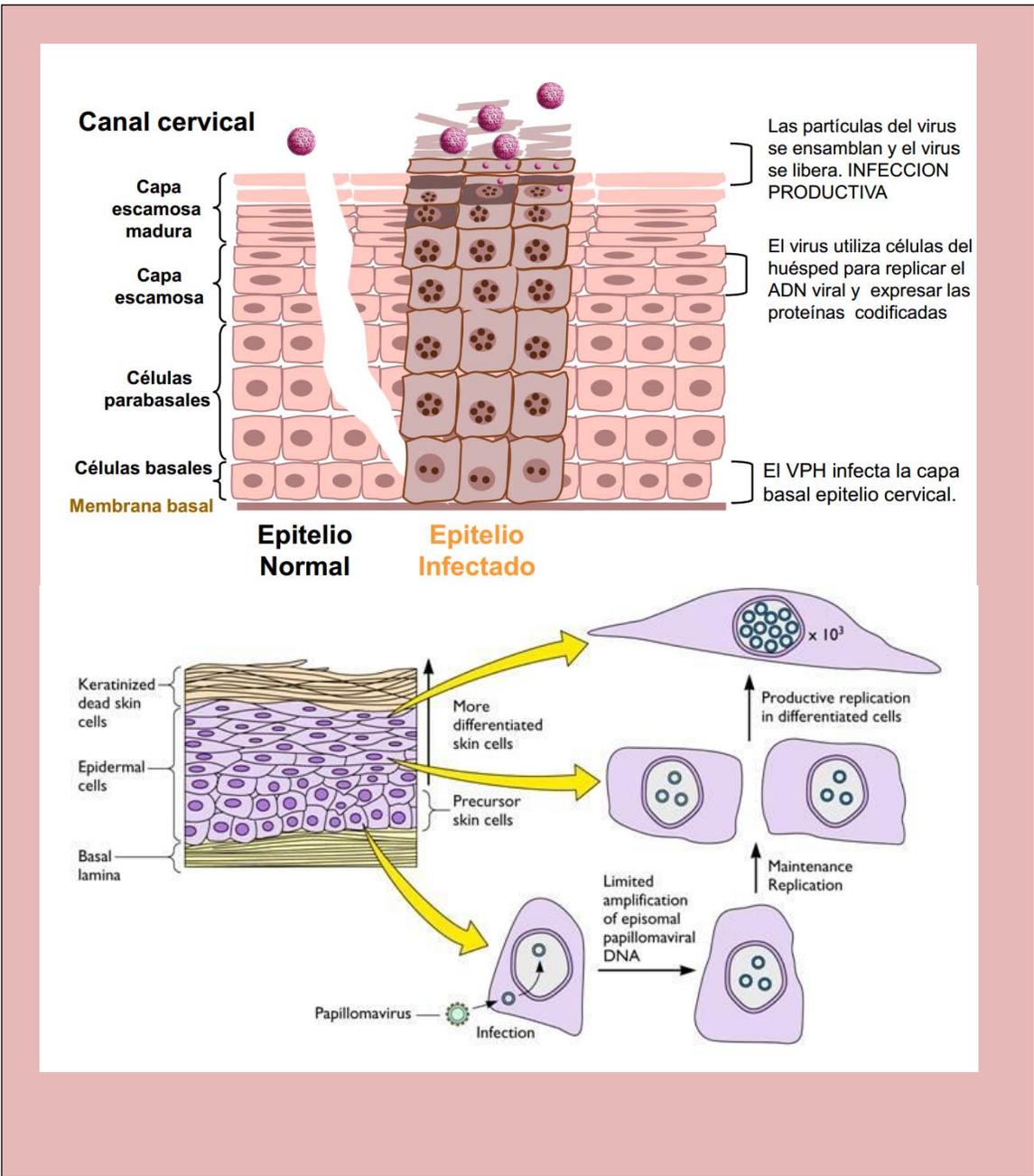


Fig. 3. Infección lítica del VPH. El ciclo viral del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula huésped.

Imagen de https://1.bp.blogspot.com/-dH1ecfAezfc/UnfKVFHxmZl/AAAAAAAAANI/h_WofpRbEfU/s1600/Sin+titulo12123.pn.

4. Detección molecular viral.

Las características histológicas sugestivas de infección por VPH son un predictor extremadamente pobre de la detección de DNA, los miembros de la familia de VPH son difíciles de cultivar *in vitro*, lo que implica el empleo de primers para detectar genes específicos de DNA del virus. Las pruebas para el diagnóstico de VPH de alto riesgo como el frotis de Papanicolaou detecta la infección por la presencia de células epiteliales coilocíticas (citoplasma vacuolado), las cuales tienen forma redondeada y aparecen agrupadas, sin embargo, las técnicas moleculares son lo suficientemente sensibles y confiables para la detección del virus. Tales como la hibridación *in-situ*, que implica el empleo de primers para detectar secuencias específicas de DNA, además de la visualización de los núcleos teñidos infectados por el VPH, bajo visión microscópica, desafortunadamente este último método es relativamente inexacto y ha sido superado por métodos biológicos moleculares. Hay esencialmente tres tipos de métodos de hibridación de ácidos nucleicos usados para detectar el VPH: análisis *in-situ* de sondas de DNA, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación de Southern blot⁽¹⁰⁾. Véase tabla 3.

Tabla 3. Detección molecular.	
Prueba.	Detecta.
Citología.	Coilocitos.
Análisis <i>in situ</i> de sondas	Ácido nucleico vírico.
PCR.	Ácido nucleico vírico.
Hibridación de Southern.	Ácido nucleico vírico.
Captura de híbridos.	Ácido nucleico vírico.

Tabla.3 Detección de VPH. * Métodos de diagnóstico molecular.

Tabla modificada de Murray *et al*⁽⁸⁾.

La captura de híbridos es un método altamente específico, para el diagnóstico de infección por VPH tanto de alto como de bajo riesgo, la hibridación *in-situ* (p.ej. hibridación *in-situ* fluorescente) permite detectar secuencias genéticas víricas específicas, en muestra de biopsia de tejido fijado y permeabilizado, Southern blot es el método molecular en donde el genoma vírico, o los fragmentos del genoma digeridos por endonucleasa de restricción son separados electroforéticamente, posteriormente se aplican sobre filtros de nitrocelulosa y se detectan mediante sondas de DNA que se hibridan con ellos, sin embargo, para muchos laboratorios PCR es el método de elección para la detección e identificación de los virus. El uso de cebadores adecuados para PCR, puede facilitar la amplificación de hasta un millón de veces de la secuencia diana en pocas horas, esta técnica es especialmente útil para detectar secuencias latentes e integradas del virus, como es el *Papillomavirus*^(6, 10). Cada ciclo de PCR consta de tres pasos, el primer paso es someter al DNA bicatenario a un tratamiento de calor, para separar las dos cadenas. Tras la separación de la cadena y ante la presencia de un gran exceso de los dos cebadores de DNA sintético, permite que estos se hibriden con las secuencias complementarias del DNA diana (segundo paso). Luego esta mezcla se incuba con DNA polimerasa y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos, de modo que se sintetiza el DNA, que comienza desde los dos cebadores (tercer paso). Se repite el proceso unos 25 o 30 ciclos^(11, 12).

La PCR puede detectar una sola copia de una secuencia de DNA en una muestra al amplificarla tanto que se torna detectable, por ejemplo, por su tinción luego de la separación mediante la electroforesis⁽¹²⁾.

5. Oncogénesis Viral.

En la infección de tipo latente o lisogénicas, ocurre predominantemente en células inmaduras (células madre basales) del epitelio escamoso. Durante la fase inicial de infección el VPH existe como episoma nuclear, los VPH-AR tienen la capacidad de integrar su genoma viral en el DNA del huésped, lo que es un paso importante en la progresión neoplásica maligna, ya que rompe el habitual estado circular en la región que codifica a E2, lo que detiene la retroalimentación negativa que esta proteína tiene sobre la transcripción de E6 y E7. Favoreciendo la producción de estas oncoproteínas sin un elemento regulatorio, provocando la immortalización de la célula por alterar el ciclo celular, a través de la inactivación de p53 y pRB respectivamente. Las altas tasas de proliferación celular y apoptosis generan inestabilidad genómica de la célula, predisponiéndola también a mutaciones externas que promueven el desarrollo de cáncer^(7, 8, 13).

El gen supresor de tumor p53 en células normales se encuentra en bajos niveles y transcripcionalmente inactivo, el daño celular desencadena un incremento en las concentraciones de dicha proteína, una vez activada inicia la vía para la reparación del DNA. El ciclo celular se detiene en fase G1 y toma la vía de apoptosis basado en el grado del daño sobre su material genético. Por lo tanto, cuando la oncoproteína E6 se une a p53 promueve su rápida degradación, mediante un complejo enzimático de ubiquitinización, lo que inactiva las funciones de p53⁽¹⁴⁾. Por otra parte, pRB al existir daño del DNA en una célula normal se une a un factor de transcripción E2F, bloqueando la transición de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, a través de la inhibición de las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (cdk), que controlan la entrada y progresión de la célula al ciclo celular. La unión de la proteína viral E7 con pRB, provoca la liberación del el factor

de transcripción E2F lo que permite la síntesis y replicación del DNA viral. Sin duda el principal factor para el desarrollo de las lesiones malignas, es la sobreexpresión de las proteínas virales E6-E7^(4, 2, 8, 11,15, 16). Figura 4.

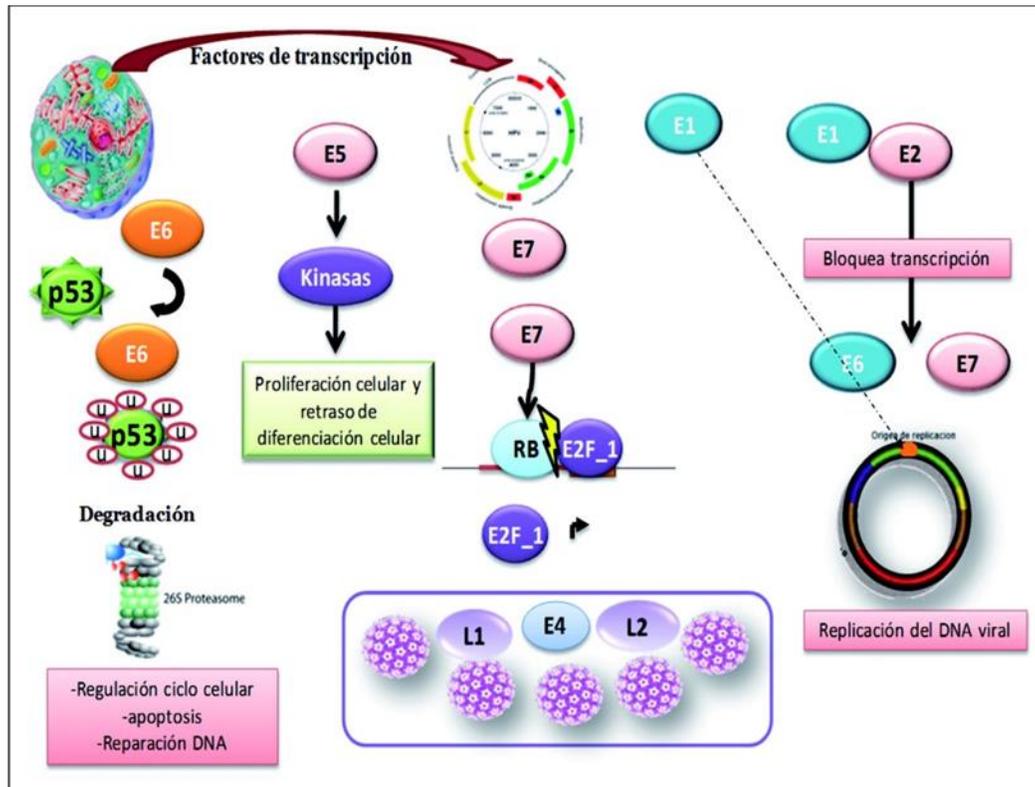


Fig. 4. Patogenia y acciones de las proteínas codificadas por VPH.

Una vez que la célula es infectada por el virus, desencadena factores de transcripción de la célula hospedera para la replicación viral, a través de E1. Por otra parte, E7 se une a pRB dejando libre al factor de transcripción E2f, lo que permite la proliferación celular. E6 induce a la ubiquitinización y posterior degradación de p53, lo que conlleva la disminución de la apoptosis. E2 regula la transcripción de E6 y E7. La proteína E5 aumenta la acción de las cinasas lo que promueve la proliferación y retrasa la diferenciación celular, finalmente E4 ayuda al ensamblaje de las proteínas estructurales L1 y L2 para el empaquetamiento de los viriones. Imagen de Silva *et al*⁽⁹⁾.

II. Células troncales del cáncer.

1. Antecedentes

El primero en utilizar el término de “stem cell” o células madre fue un investigador de origen Ruso llamado Alexander A. Maximow en 1909. Sin embargo, Virchow y Cohnhein en 1855 encontraron células cancerosas con características de proliferación y diferenciación celular parecidas a las células madre embrionarias⁽¹⁷⁾. Posteriormente en 1950 Makino *et al.* mostraron una serie de experimentos que incluían, cultivos de células cancerígenas provenientes de fluidos peritoneales de ratas que contenía, una cierta subpoblación celular que se caracterizaba por un cariotipo específico y demostraron que estas células estaban presentes en todos los tumores injertados. En la década de 1960 Pierce *et al.* publicaron resultados de su investigación en donde descubrieron, que un tipo de células cancerígenas de teratocarcinoma (tumor mixto compuesto por teratoma y carcinoma embrional, este término dejó de utilizarse en la actualidad) eran capaces de diferenciarse en tejidos maduros^(18, 19, 20).

En 1961 Till y McCulloch injertaron células hematopoyéticas de la médula ósea de un ratón sano en un ratón huésped, cuya médula ósea había sido destruida por radiación ionizante. Con este experimento, ellos demostraron que estas células dieron lugar a islotes de células madre hematopoyéticas en el bazo del ratón huésped, que posteriormente se diferenciaban en células sanguíneas maduras. Por lo tanto, las dos características básicas que definen a las células madre (autorrenovación y pluripotencialidad), fueron descubiertas.

La nueva era de investigación en CSC se inició en la década de 1990, cuando su presencia se comprobó experimentalmente, ya en el año de 1994 Lapidot *et al.* demostraron que la población celular CD34+/CD38- (características fenotípicas de las células madre hematopoyéticas) de la leucemia mieloide aguda (LMA), eran capaces de formar leucemia en ratones (NOD/SCID) donde estas células fueron trasplantadas. Actualmente la trasplatación de células en ratones NOD/SCID se han utilizado como un estándar en la investigación de CSC. Figura 5. Estos ratones tienen un sistema de inmunidad deficiente, para que no exista rechazo a las CSC trasplantadas, como sucedería en ratones inmunológicamente normales.^(18, 21).

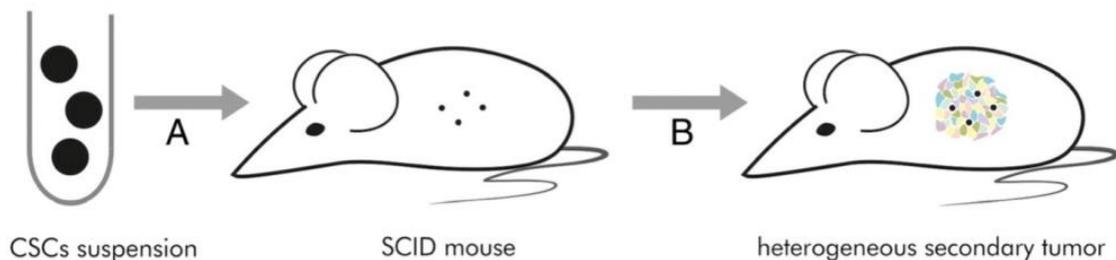


Fig. 5. Xenotransplatación de CSC dentro de ratones SCID.

Imagen de Fulawa *et al.*⁽¹²⁾.

La idea de que el cáncer emerge de las células troncales empieza en los años 90's, sin embargo con el transcurso del tiempo han existido diferentes teorías como "la des-diferenciación," que propone que el origen de los tumores se deriva de un crecimiento ilimitado de las células, que se encuentran en un estado diferenciado y progresan a uno más simple. También se menciona el patrón de desarrollo estocástico el cual sugiere que los tumores son masas heterogéneas, que pueden derivarse de cualquier tipo celular que los compone, con la condición de que se hayan producido las mutaciones necesarias que le darán la

capacidad de adaptarse y evolucionar para producir células tumorogénicas genótipicamente y fenotípicamente distintas.

Actualmente existen nuevas investigaciones que sugieren que el desarrollo del cáncer sigue una jerarquía, donde sólo un subconjunto de las células tumorales son responsables de su origen y generan todas las líneas celulares que forman el tumor, las nombraron células troncales del cáncer (CSC)^(22, 23, 24). Véase figura 6.

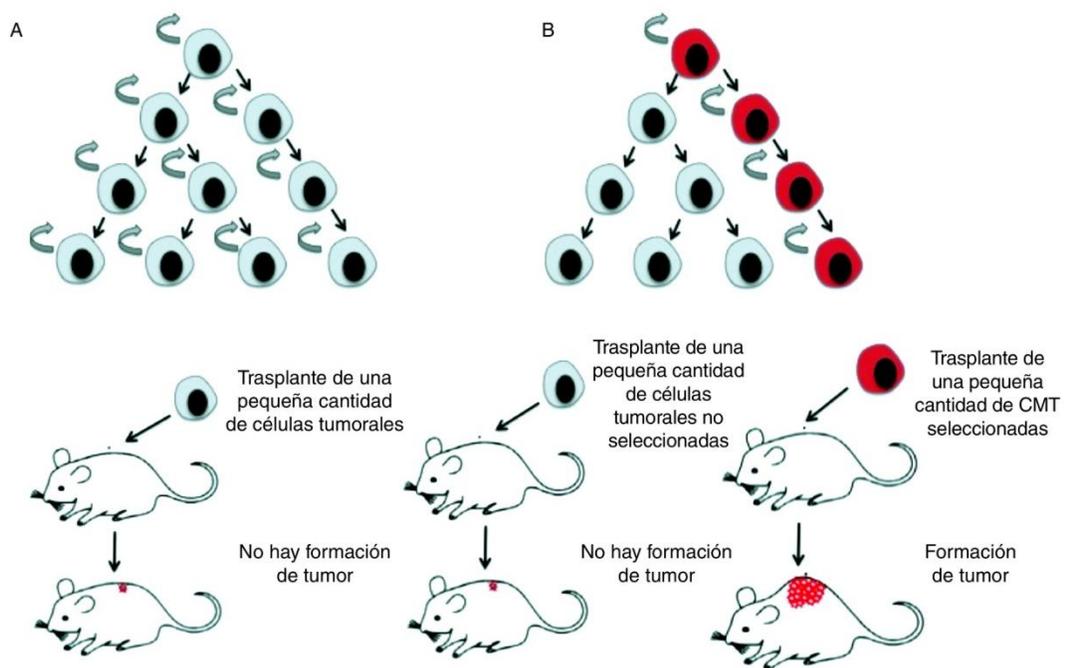


Fig. 6. Representación gráfica de los modelos del cáncer.

A. El modelo estocástico o tradicional, el cual menciona que todas las células del tumor, tienen las mismas capacidades de mantener y expandir la neoplasia. B. El modelo jerárquico de las CSC o CMT sostiene que solo una subpoblación celular es capaz de generar nuevos tumores.

Imagen adaptada de Equiara *et al*⁽²⁴⁾.

II. Definición

Debido a un creciente interés por CSC, se convocó en el 2006 a un grupo de trabajo especializado en CSC por American Association for Cancer Research (AACR) la cual definió a las células troncales del cáncer (CSC) como **“células dentro de un tumor que poseen la capacidad de autorrenovación y de originar todos los linajes heterogéneos de células que forman un tumor”**⁽²⁵⁾, además de presentar resistencia a muchas de las terapias tradicionales contra el cáncer, que posiblemente afectan únicamente a las células diferenciadas que se encuentran en la masa del tumor^(23, 24). Figura 7. Las CSC solo pueden definirse experimentalmente por su capacidad para generar un tumor en continuo crecimiento, la aplicación de este enfoque explica el uso de términos alternativos en la literatura como células iniciadoras de tumor “tumor-initiating cells” (en inglés), células oncogénicas “tumorigenic cells”⁽²⁵⁾ y finalmente “cancer stem cells” porque presentan propiedades similares a las células madre normales⁽²⁶⁾.

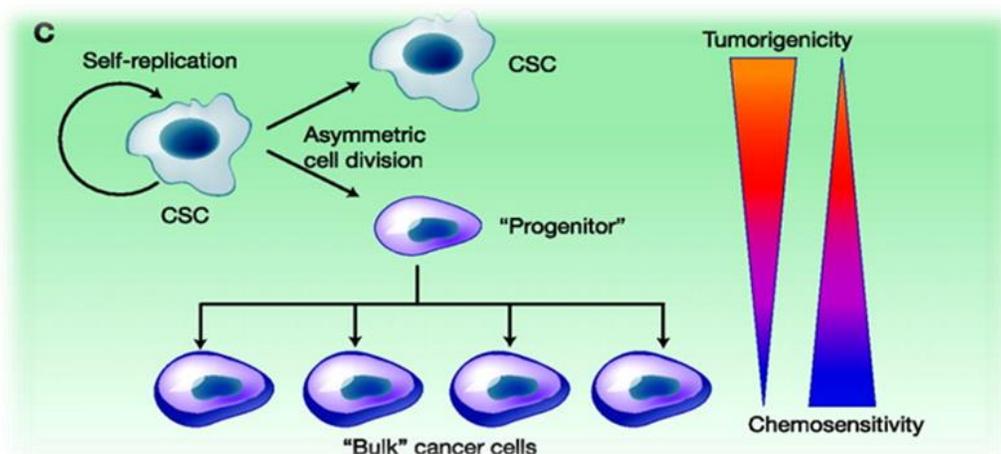


Fig. 7. Definición CSC.

Célula dentro de un tumor que posee la capacidad de Autorrenovación, (self-replication) carcinogénesis (tumorigenicity) y quimiorresistencia (chemosensitivity). La imagen ejemplifica que la mayoría de las células del tumor (bulk cáncer cell) son quimiosensibles, al contrario de las CSC que son carcinogénicas y quimiorresistentes.

Imagen adaptada de Panutti *et al*⁽¹⁶⁾.

Recordando los tres grupos básicos de células normales: son células madre, células progenitoras, células maduras o somáticas, las células madre son una población menor y cuentan con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse hacia células maduras, las primeras son responsables del mantenimiento celular y la homeóstasis, si existe una lesión en el tejido empieza la división celular para la regeneración⁽²²⁾. Sin embargo, en estos casos de normalidad las células madre rara vez se dividen para dar células progenitoras, las cuales se diferencian en un determinado tipo celular y tienen un número limitado de divisiones celulares, en contraste con las células madre que pueden dividirse a lo largo de la vida útil de organismo, siendo reguladas por vías de señalización específicas⁽²⁴⁾. Véase figura 8.

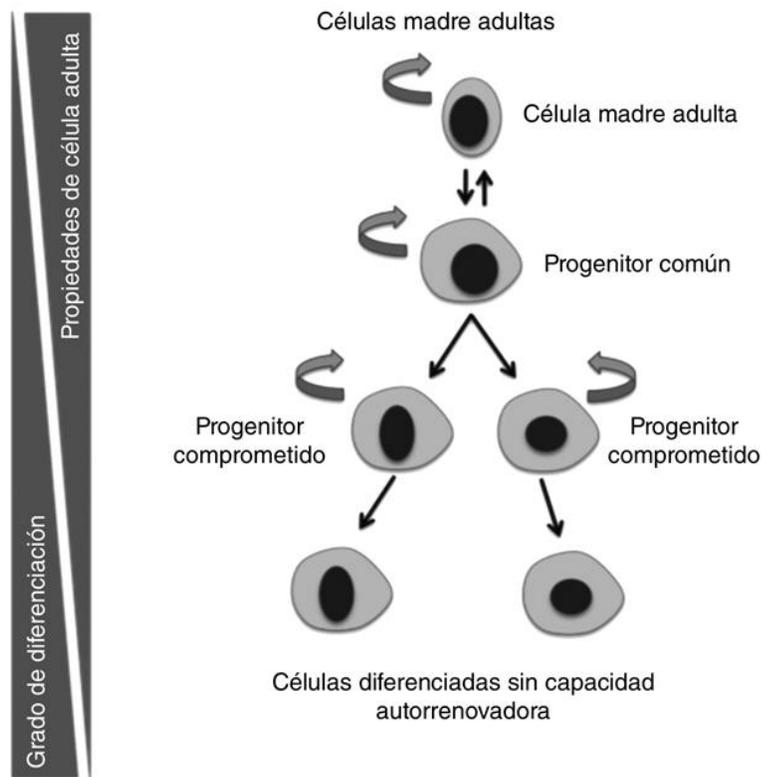


Fig. 8. Jerarquía celular de un tejido sano.

Los tres grupos básicos de un tejido sano son: células madre, células progenitoras y células somáticas.

Imagen adaptada de Eguiara *et al*⁽²⁴⁾.

Al morir las células somáticas son reemplazadas por las células maduras recién diferenciadas de las progenitoras, este proceso está estrictamente controlado por las interacciones mutuas entre todas las células que forman el tejido, es aquí donde el delicado equilibrio es alterado por diversos factores dando origen a CSC⁽¹⁸⁾. En la actualidad existen dos corrientes que describen este origen celular, la primera se refiere a que la célula madre se diferencia en célula somática y esta sufre alguna aberración que la transforma en CSC, o que la transformación maligna proviene directamente de una alteración genética o epigenética en la célula madre⁽²⁶⁾. Véase figura 9.

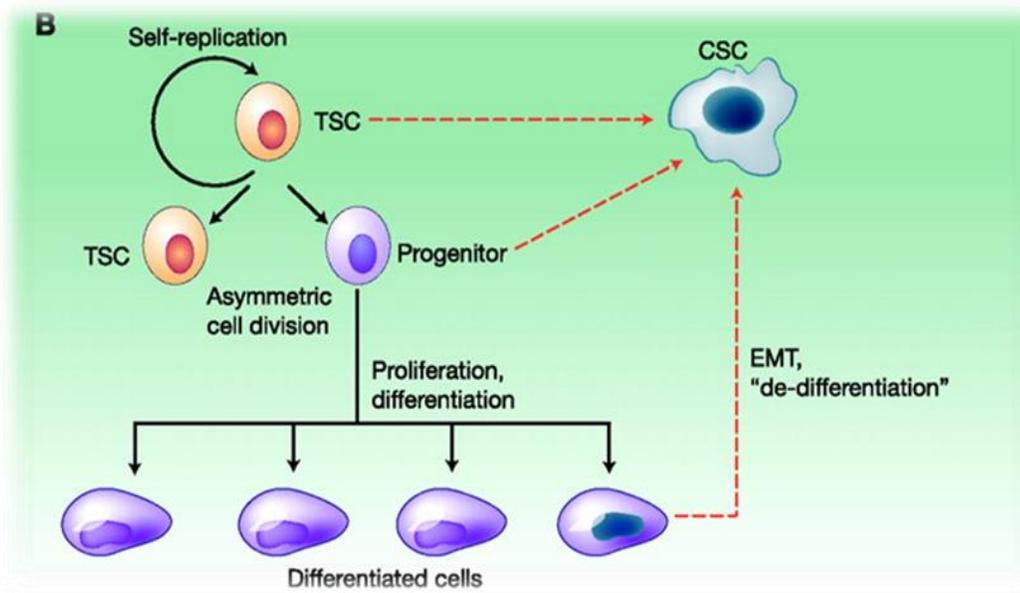


Fig. 9. Origen CSC.

Los dos posible orígenes de las CSC la primera hipótesis es que se origine de la célula madre (TSC) y se transforme en CSC o que la célula progenitora sufra los cambios genéticos o epigenéticos (→) y origine CSC. Imagen adaptada de Panutti *et al*⁽¹⁶⁾.

III. Características de las CSC

Las características de las CSC están asociadas a una sobreexpresión de genes y factores de crecimiento, que comparten con las células madre e impactan en las vías de señalización celular. Al conjunto de estas características se les conoce como “troncalidad”^(18, 26, 27, 28). Figura 10.

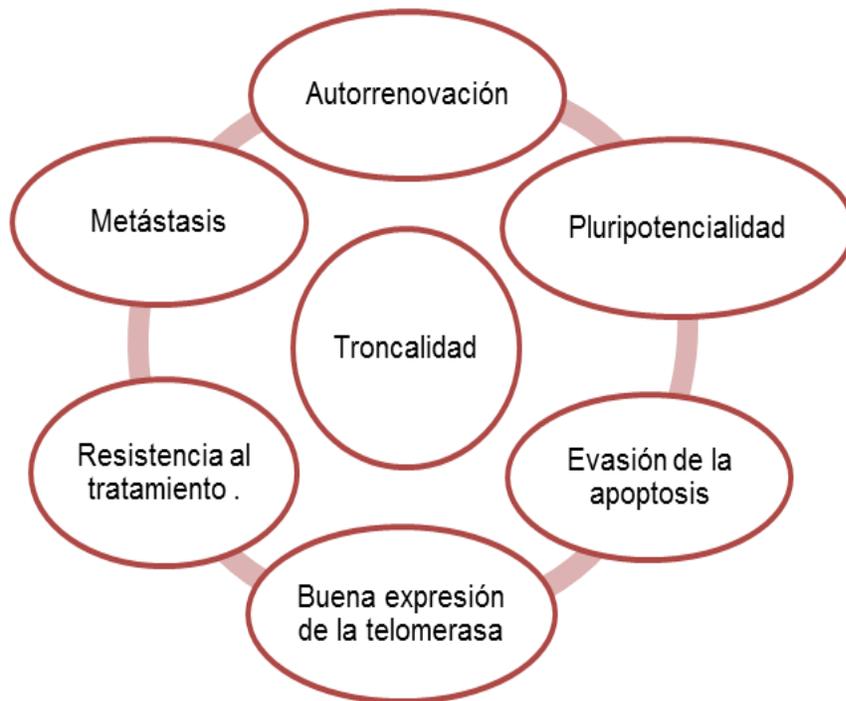


Fig. 10. Características de CSC.

Al conjunto de estas características se les conoce como troncalidad.

3.1 Autorrenovación.

La propiedad de autorrenovación se define, como la capacidad de generar descendientes que mantengan las mismas características de la célula madre, en este caso de las CSC la cual se logra por medio de la división asimétrica que consiste en que una de las hijas sea una célula

madre o CSC y la otra se dirige a un programa de diferenciación^(18, 27).
Figura 7.

3.2 Pluripotencialidad.

La pluripotencialidad de las CSC le otorga la habilidad de producir poblaciones celulares heterogéneas en los tumores, según el modelo de CSC supone que el tejido tumoral está organizado jerárquicamente, la población de CSC es responsable del crecimiento y progresión del tumor, la heterogeneidad significa presencia de células en diferentes etapas de maduración, sin embargo la evolución clonal de estas células aumenta su heterogeneidad fenotípica^(18, 28). Véase figura 11.

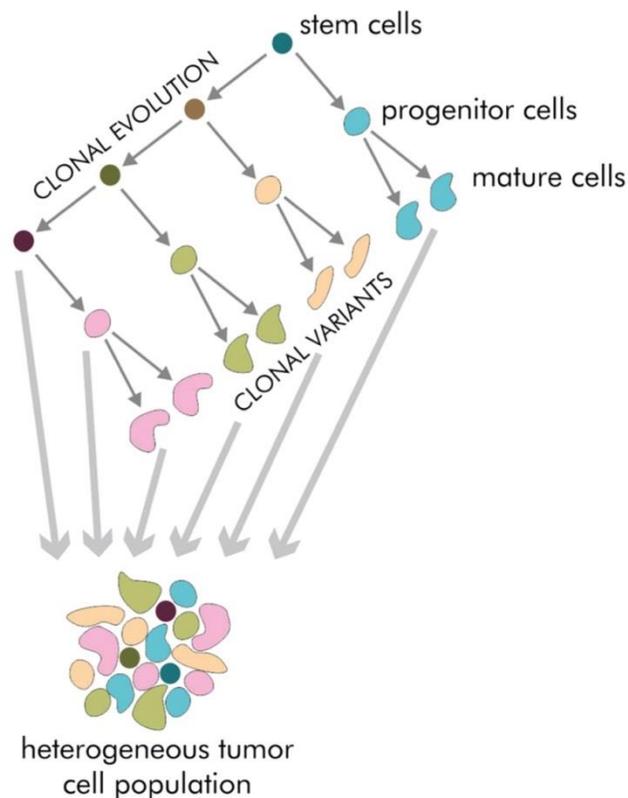


Fig. 11. Evolución clonal.

Las diferencias en los estados de madurez celular provocan una población celular heterogénea del tumor. Imagen de Fulawa *et al*⁽¹⁸⁾.

3.3 Buena expresión de la telomerasa.

La buena expresión de la telomerasa de las CSC se refiere, a que la activación de la telomerasa y el mantenimiento de los telómeros son importantes en el cáncer y las características de troncalidad^(27, 29). Debido a que el telómero es una estructura en los extremos del cromosoma asociada a una secuencia de DNA no codificante, que contrarresta la tendencia del cromosoma a acortarse con cada ronda de replicación. Por medio de su enzima telomerasa, la cual tiene actividad de transcriptasa inversa (sintetiza DNA a partir de una secuencia de RNA que ella misma aporta) agrega los nucleótidos que se pierden cada vez que se duplica la célula, sin embargo la longitud del telómero alcanza cierto límite y se interrumpe la mitosis en células normales⁽¹¹⁾. Es un mecanismo de control de división celular, y en las CSC se encuentra alterado, lo que aumenta la posibilidad de descontrol del crecimiento celular.

3.4 Evasión de la apoptosis.

Es una de las características de las CSC que la hacen potencialmente resistente a los tratamientos convencionales del cáncer. Los principales mecanismos involucrados son: Inhibición de p53; autofagocitosis; descontrol de la familia Bcl2

Inhibición de p53

La literatura menciona que los genes supresores de tumores clásicos como p53, tienen un importante papel en la modulación de las características troncales. P53 generalmente conocido por su papel en el mantenimiento de la integridad genómica, mediante la regulación de las vías del ciclo celular y la muerte celular, es un mecanismo represor de las células troncales del cáncer, sin embargo se encuentra inhibida en

este tipo celular, por alguna aberración causada, por ejemplo por un virus oncogénico, lo que conduce a una evasión de la apoptosis.

Jain *et al.* mencionan que p53 también tiene un papel importante en la diferenciación de las células madre embrionarias, por lo cual si se inactiva esta vía, la célula madre puede reprogramar de manera más eficiente a la pluripotencialidad como en el caso CSC. Chice *et al.* mostraron que la pérdida de p53 resulto en un mayor número de células madre en el epitelio mamario ^(29, 30, 31).

✚ Autofagocitosis.

Es la degradación de proteínas y orgánulos de la misma célula que en exceso lleva a la muerte celular, uno de los genes encargados de esta regulación es Beclin-1. En las CSC Beclin-1 se encuentra inhibido, por lo que la autofagia proporciona una respuesta protectora, manteniendo la viabilidad de la célula tumoral, utilizando sus propios recursos para sobrevivir. Se ha relacionado con la quimiorresistencia ya que la mayoría de los tratamientos farmacológicos aumenta el stress celular en las CSC y con este la autofagia. Por eso se le considera como un mecanismo de evasión de la muerte celular ^(15, 32).

✚ Descontrol de la familia Bcl2.

La maquinaria encargada de la apoptosis parece ser similar en todas las células animales. Interviene la familia de proteasas caspasas, llamadas procaspasas, estas enzimas degradan proteínas clave de las células desmantelándola de forma rápida y limpia, sus restos pronto son incorporados y digeridos por otra célula. Las principales proteínas que regulan la activación de las procaspasas son miembros de la familia Bcl2 proteínas intracelulares, algunas promueven la muerte celular y otras inhiben este proceso, las proteínas Bax y Bak son proapoptóticas,

mientras que la propia Bcl-2 inhibe la apoptosis. El equilibrio entre las actividades de los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl2 determina si una célula vive o muere. En las CSC se encuentran sobre-expresados familia de Bcl-2 que inhiben la apoptosis. Según Sinha *et al.* encontraron que en una línea celular específica para células troncales del cáncer oral, estaban incrementados en altos niveles genes de supervivencia como BCL2 y BCL2A1, la inactivación de apoptosis en las CSC contribuye a la supervivencia y autorrenovación en medios ambientes hostiles, así como a evadir la citotoxicidad de la mayoría de las terapias contra el cáncer ^(11, 32, 33).

3.5 Habilidad de migrar y generar metástasis.

En las CSC esta característica se debe a la sobreexpresión de ciertos genes y vías de señalización, como son Nanog el cual es un factor de transcripción esencial para mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias, no se expresa en tejidos normales de adultos, sin embargo se ha encontrado sobreexpresado en muchos tipos de cáncer humanos junto con Oct4 (factor de transcripción). En recientes estudios sobre líneas celulares de cáncer se encontró sobreexpresado Nanog y Oct4, al ser ambos inhibidos, se descubrió que se invierte el proceso de transición de epitelio a mesénquima (EMT) que da origen a la migración de la células, es decir se inhibió el proceso de metástasis. Lu *et al.* mencionan que se han realizado estudios in vivo en ratones transgénicos en donde se permitió la expresión inducible de Nanog, los hallazgos fueron que Nanog por sí solo no iniciaba la formación de tumor, pero asociado con Oct4 y Sox2 promovían la carcinogénesis y la metástasis ^(22, 34).

Nanog también está relacionado con inducir el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que tiene un papel importante en la angiogénesis y por lo tanto en la metástasis⁽³⁴⁾.

✚ EMT y CSC.

Transición epitelio-mesénquima (EMT), es el proceso que permite a una célula epitelial polarizada asumir propiedades fenotípicas de célula mesenquimatosa, a través de la inhibición de los genes que codifican a las proteínas encargadas de las uniones adherentes y estrechas de las células epiteliales, así como de su polaridad apico-basal (Par, Crumbs, Scribble) esta inhibición les da características de motilidad e invasividad. Véase tabla 4. Por otro lado, EMT tiene un proceso importante en la embriogénesis y fisiología en el epitelio ovárico, el cual se somete a EMT durante la cicatrización de heridas después de la ovulación, y recientemente ha sido implicado en patologías, incluyendo fibrosis y cáncer. La adquisición de características fenotípicas mesenquimales se relaciona directamente con el incremento de las células invasivas del tumor, por lo tanto de la metástasis y desfavorable pronóstico clínico. Recientes estudios sugieren que EMT está directamente involucrado en las características de CSC, por ejemplo Zhang *et al* mencionan que un grupo de investigación sometieron a células epiteliales de tejido mamario a EMT, y descubrieron que estas células adquirieron propiedades de CSC al formar modelos de esferas in vitro así como tumores en xenotransplantes in vivo. Por lo tanto se relaciona el proceso de EMT con la habilidad de migrar y crear metástasis de las CSC^(18, 35). Tabla 4.

Otras vías de señalización importantes son Wnt, Notch, Hedgehog, Nucleosim, etc. Se describen en la tabla 5, sus funciones en células madre normales y en CSC⁽¹⁸⁾.

Tabla 4. Características de EMT.		
	Células epiteliales.	Células mesénquimas.
Morfología.	En capas y polarizadas.	Elongadas y no polarizadas.
Desarrollo.	No motilidad. No invasividad.	Migración. Invasividad.
Marcadores.	E-cadherina. Despmoplakin. Cytokeratin.	Vimetin. N-cadherin. Snail.

Tabla 5. Características de EMT.

EMT transición epitelio-mesénquima.

Imagen de Zhang *et al*⁽²⁴⁾.

3.6 Resistencia al tratamiento.

La suma de las características anteriores da como resultado la resistencia a la quimioterapia y radioterapia en CSC, sin olvidar que todas estas características son dependientes de la sobreexpresión o inhibición según sea el caso de algunos genes, factores de transcripción y vías señalización. Tabla 5.

Tabla 5. Principales genes, vías de señalización CSC.				
GEN.	Función Célula Normal.	Sobreexpresión o inhibición en CSC.	Función en CSC.	Referencias.
Nanog.	Mantiene la pluripotencialidad en células madre embrionarias.	Sobreexpresión.	Induce la expresión de PDGF, promoviendo la carcinogénesis y metástasis.	(22, 25, 34, 36)
Oct -4.	Pluripotencia.	Sobreexpresión.	Carcinogénesis y metástasis.	(22, 25, 36)
SOX2.	Pluripotencia.	Sobreexpresión.	Carcinogénesis y metástasis.	(22, 25, 36)
Vía de señalización.				
WNT.	Control de proliferación y migración celular.	Sobreexpresión.	Se asocia a metástasis ya que se encuentra en altas concentraciones en células que perdieron expresión de E-Cadherina y β -catenina y resistencia a la apoptosis.	(22, 27)
Notch.	Regula la diferenciación celular.	Sobreexpresión.	Autorrenovación y supervivencia de CSC.	(22, 27, 37)
	Regula la autorrenovación y reparación de los tejidos normales.		Asocia a la reincidencia del tumor, después de tratamiento.	
			Metástasis por llevar acabo EMT. Sobre expresión de Notch3, provoca resistencia a la quimioterapia basada en platino.	

			Notch1 y 2 protege a las CSC de la radiación.	
Hedgehog.	Importante en la organogénesis.	Sobreexpresión.	Iniciación, mantenimiento y crecimiento del cáncer.	(22, 23, 27)
	Induce a la diferenciación.			
	Mitógeno.			
	Media la interacción entre epitelio y T. conectivo.			
Musashi.	Induce a la pluripotencialidad.	Sobreexpresión	Incremento en la proliferación celular y metástasis.	(22, 25, 38)
	Media la interacción entre epitelio y T. conectivo.			
	Regula la proliferación y la apoptosis.			
Nucleosemin.	Autorrenovación cuando ocurre un daño al DNA.	Sobreexpresión.	Metástasis y proliferación celular.	(25, 29, 39, 40)
P53.	Apoptosis cuando hay daño o mutación en el DNA.	Inhibición.	Reprograma la pluripotencialidad.	(29, 30, 41)
			Inhibe la apoptosis.	
pRB.	Punto de control de la mitosis al unirse con el factor de transcripción E2f.	Inhibición.	Crecimiento descontrolado y diferenciación celular.	(29, 36, 42)

Tabla 5. Principales genes y vías de señalización CSC.

El cuadro representa alguna de las funciones normales de los genes en las células madre y su función con la inhibición o sobreexpresión de estos genes en las CSC. EMT* Proceso por el cual las células adoptan características fenotípicas mesenquimales, perdiendo su adhesión intercelular y adquiriendo habilidad para migrar a otras localizaciones.

IV. Biomarcadores de CSC.

Sánchez *et al* definen a los biomarcadores como “moléculas que se expresan en niveles anormales, en ciertos tipos de cánceres y pueden ser utilizados para diagnosticar o analizar la evolución de alguna enfermedad”⁽³³⁾. En el caso de CSC Fulawa *et al.* mencionan que no hay marcadores universales de CSC, y que es un error común suponer que el fenotipo de CSC es idéntico o similar en otro tipo de tumor, y Villanueva *et al* coinciden con que los marcadores no han sido claramente establecidos⁽⁴³⁾. Sin embargo, la literatura menciona dos grupos de biomarcadores que destacan entre muchos son: los antígenos de membrana y factores de transcripción, donde los antígenos de membrana son los más útiles para reconocer a CSC, debido a que permiten el aislamiento de células intactas^(18, 33).

Como antecedente se sabe que las primeras CSC identificadas por biomarcadores fueron CD34+CD38- para leucemia mieloide y CD44+/CD24- para cáncer de mama, en donde lograron iniciar un tumor secundario en ratones NOD-SCID. Con el paso del tiempo descubrieron otro antígeno de membrana, CD44 que es común en células iniciadoras de cáncer en próstata, páncreas y en carcinoma de cabeza y cuello (CCECyC). CD133 se descubrió en neoplasias cerebrales, colorrectal y de pulmón. Finalmente CD90+/CD45- se encontró en las CSC del carcinoma hepatocelular^(18, 33, 44). En la tabla 5 se resumen los marcadores de membrana y en los tipos de neoplasia identificados.

Tabla 5. Biomarcadores de membrana de CSC y neoplasias malignas.	
Antígenos de membrana.	Neoplasia maligna.
CD34+CD38-.	Leucemia mieloide aguda.
CD44+/CD24-.	Cáncer de mama.
CD44.	Carcinoma de cabeza y cuello, próstata y páncreas.
CD133.	Neoplasia cerebral, colorrectal y de pulmón.
CD90+/CD45-.	Carcinoma hepatocelular.

Tabla 5. Biomarcadores de membrana de CSC y neoplasias malignas.

La tabla nos resume los principales marcadores de membrana descritos en la literatura para CSC encontrados en diferentes tipos de neoplasias.

En el 2006 Takahashi y Yamanaka descubrieron cuatro factores de transcripción (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4) involucrados en la des-diferenciación de fibroblastos de ratón, a células con capacidad de pluripotencialidad dándoles el nombre en inglés “induced pluripotent stem cell” (iPSCs), más adelante Yu *et al.* encontraron, que con solo tres factores de transcripción (Oct4, Sox2 y Nanog) era suficiente para crear iPSCs⁽⁴⁵⁾. En el 2013 Buganim *et al.* publicaron un estudio acerca de la reprogramación celular, utilizando y describiendo los factores de transcripción descubiertos por Takahashi *et al* para mejorar la calidad de iPSCs con fines de estudio⁽⁴⁶⁾. Por su capacidad para des-diferenciar células somáticas, los factores de transcripción se consideran biomarcadores de CSC, no obstante los marcadores de superficie se prefieren por las razones ya mencionadas^(18, 46). Véase figura 12.

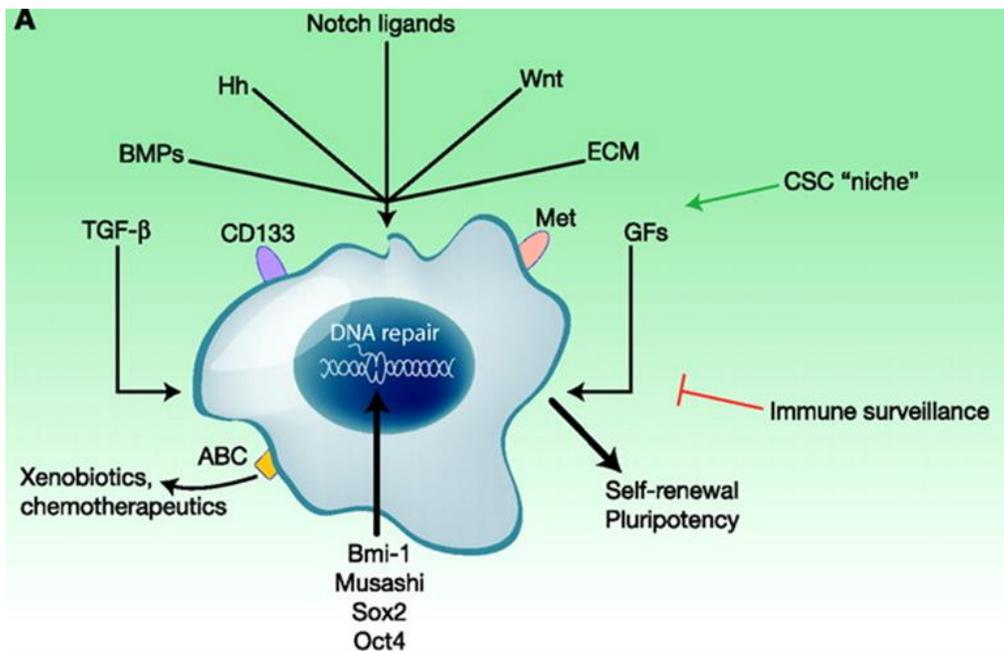


Fig. 12. Factores de transcripción como biomarcadores de las CSC.

La imagen representa una CSC con sus vías de señalización involucradas, factores de crecimiento y biomarcadores de transcripción como son Bmi-1, Musashi, Sox2 y Oct4. Así como proteínas de membrana CD133, Met y ABC esta última relacionada con la quimiorresistencia. Imagen adaptada de Panutti *et al*⁽¹⁶⁾.

Otro biomarcador de CSC considerado importante es la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH) por su elevada actividad en carcinoma hepatocelular, leucemia mieloide y cáncer de próstata⁽¹⁸⁾.

ALDH está implicada en la diferenciación celular, desintoxicación y resistencia a los fármacos, Zhang *et al.* mencionan que se ha encontrado sobrepresado ALDH en un grupo de células con características de carcinogénesis, pluripotencialidad y autorrenovación en el cáncer de pulmón⁽³²⁾. Fulawa *et al.* dicen que no podemos esperar que los marcadores CSC sean claramente definidos o específicos para cierta entidad tumoral, un subconjunto de células aisladas con ciertos marcadores de expresión no equivale a una población de CSC. Si fuera así cada célula aislada sería capaz de formar esferas o generar

tumores secundarios después de los xenotransplantes, no obstante la expresión de los biomarcadores en un grupo de tumores, nos ayuda a predecir algunos de los resultados clínicos, por ejemplo el biomarcador CD133 presente en las células del glioblastoma, se le atribuyeron características troncales debido a que evadieron la vía de apoptosis y formaron un tumor secundario en ratones, a pesar de haber sido sometidas a radiación, lo que sugiere un pronóstico desfavorable para el paciente^(18, 27, 35).

V. Modelo de esfera para el estudio de CSC.

El modelo de esfera es creado para determinar, la habilidad de las líneas celulares para generar estructuras tridimensionales in vitro, a través de su agregación celular, provocada por factores de crecimiento. Con el principal fin, del estudio del comportamiento de las células cancerígenas incluyendo a las CSC. Pertenece a uno de los seis modelos 3D in vitro que actualmente se conocen^(47, 48).

Las agregaciones de las líneas celulares in vitro llamadas también esferoides han sido usadas por décadas para recapitular el ambiente tisular in vivo de las neoplasias. Debido a que imitan, la masa tumoral que tiene diferentes tipos de células. Algunas células se encuentran expuestas en la superficie, algunas otras células en el interior del tumor, células en proliferación, células no proliferantes, células bien oxigenadas y algunas hipoxicas, reproduciendo mejor las condiciones de crecimiento y parámetros del microambiente tumoral como la oxigenación y el gradiente de nutrición celular. En contraste con los cultivos celulares de monocapa, que no puede reproducir las características del tumor anteriormente mencionadas porque se encuentra en 2D (bidimensionales) dispersas en el medio de cultivo, por

lo que no existe interacción célula-célula ni las interacciones célula-matriz extracelular.⁽⁴⁹⁾. Véase figura 13.

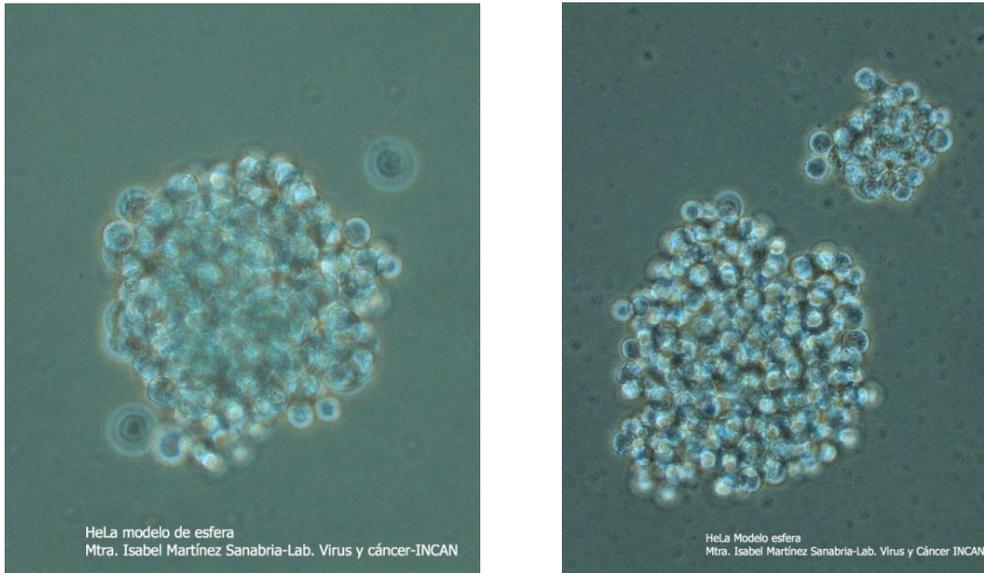


Fig 13. HeLa modelo de esfera.

Las imágenes nos muestran la agregación celular de HeLa (línea celular específica para CaCu) llamadas también esferoides.

Cortesía de Mtra. Isabel Martínez Sanabria-Lab. Virus y cáncer-INCAN.

Diversos estudios mencionan que el cultivo tridimensional se ha utilizado para comprobar la efectividad, de los fármacos pre-clínicos en contra del cáncer, pudiendo dar mejores resultados que en los cultivos en monocapa, debido a que explica mejor la biología de tumor^(24, 48, 49). Por otra parte Kimlin et al mencionan que también se pueden identificar en modelos in vitro 3D las características clásicas de la carcinogénesis por CSC, que incluyen la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a los inhibidores de crecimiento, evasión de la

apoptosis, ilimitada capacidad de replicación, sostenida angiogénesis e invasión de tejidos y metástasis⁽⁴⁸⁾. Figura 14.

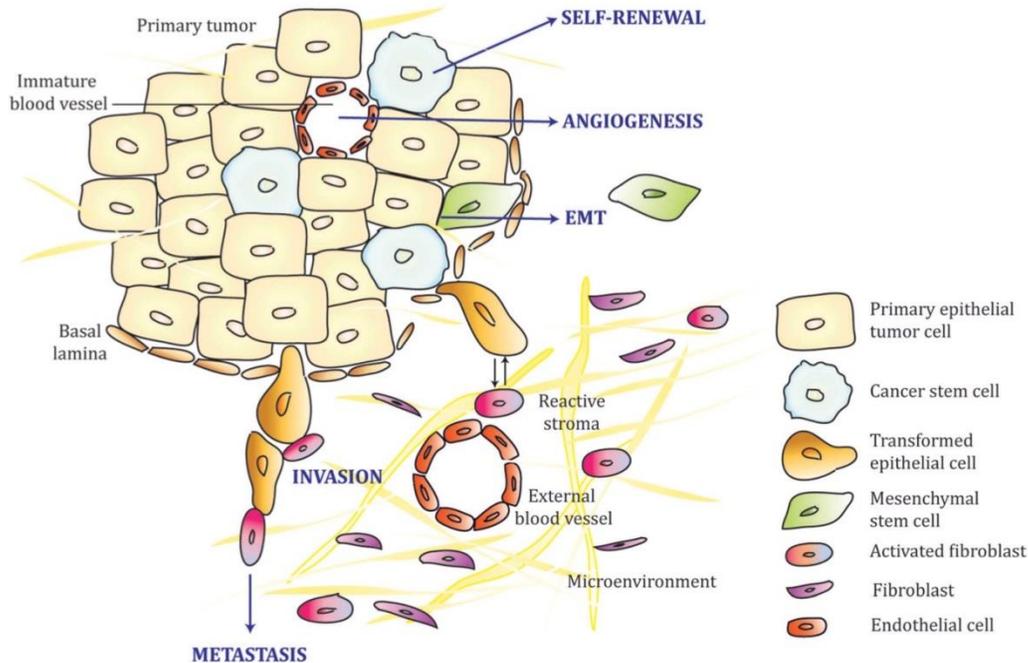


Fig. 14. Características de la carcinogénesis en modelos in vitro 3D.

En la imagen se muestra las características clásicas de la oncogénesis por CSC que pueden demostrarse a través de los modelos 3D in vitro como son autorrenovación, angiogénesis, EMT, habilidad de invasión y metástasis.

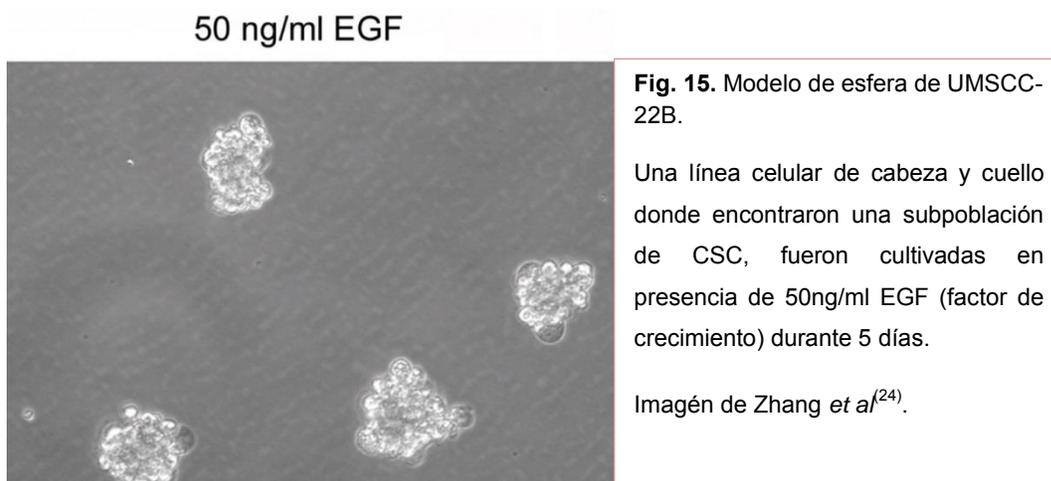
Imagen de Kimlin *et al*⁽³⁵⁾.

López *et al* utilizaron el modelo de esfera en líneas celulares específicas para CaCu (HeLa, SiHa, Ca Ski y C-41). Identificaron a una subpoblación de CSC a partir de una relación entre la expresión de ciertos biomarcadores (ALDH1, CD44, ITGB1, PSCA, NT5E, MYC, entre otros) con la eficiencia en la formación de esferas, encontrando

también que la población de CSC presentaba mayor resistencia a la radiación ionizante, y generaba fenotipos tumorales reproducibles en ratones inmunosuprimidos⁽²⁵⁾.

Las esferas derivadas de las CSC en CaCu expresaron altamente el biomarcador CD49f, una integrina alfa-6, esta proteína es considerada el principal receptor de la infección por VPH-AR, por lo que postularon que las células que expresaban CD49f podrían ser el blanco de infección por VPH-AR durante la carcinogénesis. Además que los marcadores asociados a EMT fueron encontrados altamente expresados en células esferoidales⁽²⁵⁾.

Por otro lado, Zhang *et al.* realizaron un modelo de esfera para UM-SCC-22B (línea celular de cáncer de cabeza y cuello) en donde mencionan que una subpoblación celular presentan características de CSC⁽³⁵⁾. Figura 15.



III Virus del papiloma humano y CSC.

Las CSC son un subgrupo de células dentro de un tumor que poseen propiedades similares a las células madre, principalmente la capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad; anteriormente descritas. Por otro lado la literatura propone que una célula indiferenciada con infecciones oncogénicas (VPH) o cambios genéticos, da pie a células iniciadoras de tumor o CSC, no obstante diversos estudios han sugerido que las células diferenciadas con estas mismas variables pueden provocar resultados similares, a través de la reprogramación celular (des-diferenciación) mediada por VPH, promoviendo también la formación de CSC⁽⁵⁰⁾.

1. CSC en carcinoma oral.

El cáncer que se forma en los tejidos de la cavidad oral o la orofarínge se conocen como carcinoma oral, donde aproximadamente el 90% son carcinomas de células escamosas (CCS), las cuales se presentan comúnmente en el paladar blando, piso de boca, encías, lengua y zona retromolar, los pacientes sintomáticos pueden presentar: dolor no específico, odontalgia, pérdida de dientes, disartria, disfagia, odinofagia, otalgia, compromiso sensorial o motor de un nervio y linfadenopatía cervical. Estos síntomas seguidos de placas blancas o rojas (leucoplasia y eritroplasia), heridas o úlceras incurables, masas con ulceración central, bordes no bien delimitados y lesiones exofíticas o endofíticas. Los principales factores relacionados al carcinoma oral son el tabaco y el alcohol con un efecto sinérgico en el desarrollo del cáncer, además de la infección de VPH involucrada con los serotipo 16 y 18, considerados de alto riesgo^(5, 14, 51, 52). Sin embargo, el VPH 16, es el más asociado al carcinoma oral y orofaríngea⁽⁵³⁾, mientras que el

subtipo 18 se ha vinculado con el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas.(leucoplasia y liquen plano)⁽⁵²⁾.

El cáncer oral como otras neoplasias, es una masa celular heterogénea formada principalmente por tres tipos celulares, según su grado de diferenciación: células diferenciadas, células en tránsito de diferenciación con máxima proliferación y finalmente una pequeña población de células indiferenciadas con elevada plasticidad (CSC) que contribuye al crecimiento y formación de células tumorales con una diversidad fenotípica.

Varios estudios han implicado a las CSC en el carcinoma oral por la progresión, invasión y recurrencia del tumor después de haber recibido tratamiento, así como la alta morbilidad y mortalidad de los pacientes con este padecimiento, el reiterado crecimiento del tumor después del tratamiento se adjudica a una sobreexpresión de las principales vías de señalización anteriormente mencionadas (Wnt, Hg y Notch) así como su quimiorresistencia y radiorresistencia asociados a los mecanismos de protección normales de las células madre por lo que Sinha *et al* sugieren, la hipótesis de que las CSC se pueden originar de las células madre epiteliales, debido a que tienen un mayor riesgo y probabilidad de adquirir mutaciones en los genes que afectan la división y la supervivencia celular, debido a su baja tasa de proliferación y alta capacidad de autorrenovación, al contrario de las células basales epiteliales que no permiten el tiempo suficiente para acumular cambios genéticos necesarios para el desarrollo del carcinoma, debido a que su tasa de supervivencia es de 14-24 días y tienen una nula capacidad de autorrenovarse⁽³²⁾.

Por otro lado, el patrón asimétrico de la células madre proporciona un estado estacionario en el que el número de células madre se mantiene constante, mientras se suministra en forma continua células

diferenciadas, sin embargo también existe la posibilidad de que las células madre se dividan en forma simétrica, es decir generando dos células madre o dos células comprometidas a la diferenciación, cual sea el caso las células madre que ya adquirieron las mutaciones, pueden dar lugar a la expansión de las células con alto riesgo a la transformación maligna⁽³²⁾. Figura 16.

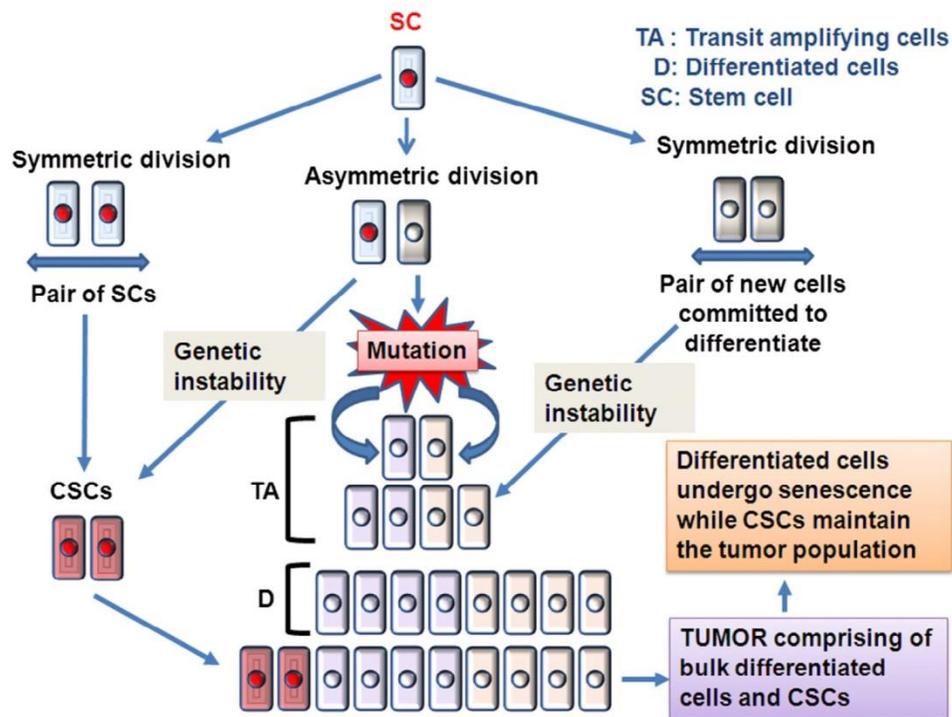


Fig. 16. CSC en carcinoma oral y sus divisiones celulares.

Durante la división de las CSC del cáncer oral, las células madre del epitelio se dividen: simétrica y asimétricamente. La división simétrica resulta, dos células madre (SC), mientras que el segundo grupo dos pares de células diferenciadas. Por otro lado la división asimétrica resulta una célula madre (SC) y otra diferenciada. Después de un número finito de divisiones celulares se forman un alto número de células diferenciadas, células en tránsito en máxima proliferación (TA) y una pequeña población de SC. La inestabilidad genética debida a mutaciones en células madre normales y en células TA resulta en la formación de tumores malignos. La mayoría de las células que conforman la masa tumoral (Bulk) son células diferenciadas que sufren senescencia, mientras que CSC son las encargadas de mantener la población tumoral.

Imagen adaptada de Sinha *et al*⁽²²⁾.

Células maduras (diferenciadas) y las células progenitoras pueden sufrir des-diferenciación y originar CSC en el carcinoma oral es otra hipótesis que plantean Sinha *et al.* debido a que las células progenitoras están parcialmente diferenciadas y al dividirse dan origen a células maduras completamente diferenciadas. Las mutaciones oncogénicas actúan como un impulso, para conducir el proceso de des-diferenciación de las células progenitoras y de las células maduras, para que vuelvan adquirir el potencial de autorrenovación de las células madre, dando así un posible origen a CSC. Por otra parte, el VPH puede jugar un papel importante en este proceso de des-diferenciación y oncogénesis.

El VPH tipo 16 se ha encontrado relacionado con carcinomas orales, principalmente de la zona orofaríngea^(5, 53, 54). La infección inicia, a través de una microabrasión en donde el VPH 16 infecta a la célula madre del epitelio oral, integra su DNA en la célula huésped durante períodos de tiempo prolongados, y el virus empieza a expresar sus principales proteínas oncogénicas E6-E7 que intervienen en la función de p53, pRB, Notch-1, ciclina D1 y EGFR. La infección por VPH inicialmente produce una lesión pre-maligna que con el tiempo avanza a una transformación maligna, la literatura menciona que E6-E7 activan la vía de señalización Wnt y esto podría estar involucrado en la des-diferenciación de las células epiteliales a las CSC del cáncer oral. Véase fig 17. Además de que los genes supresores pRB y p53 no solamente intervienen en el mecanismo de la carcinogénesis, sino que también, pueden desempeñar un papel importante en la plasticidad celular y en las características de troncalidad^(30, 41, 55). No está claro aún si las CSC se pueden originar a partir de la infección de VPH en las células madre epiteliales, o de la infección de este virus en las células basales, provocando la des-diferenciación y transformación a CSC, sin

embargo Tang *et al.* en la universidad de Michigan crearon una línea celular UM-SCC-104 de CCECyC con VPH(+) que presentan características de CSC, esta línea celular será un recurso importante para comenzar a investigar más a fondo como estas variables combinadas contribuyen a la formación de una neoplasia maligna, así como la respuesta o resistencia a los tratamientos^(32, 56).

Por otro lado el hábito de fumar es considerado uno de los principales factores de riesgo de carcinoma oral, debido a que la nicotina y sus metabolitos pueden afectar a las células madre epiteliales y su nicho, perturbando vías de señalización bioquímicas, que se sabe son importantes en el origen de las CSC. Figura 17.

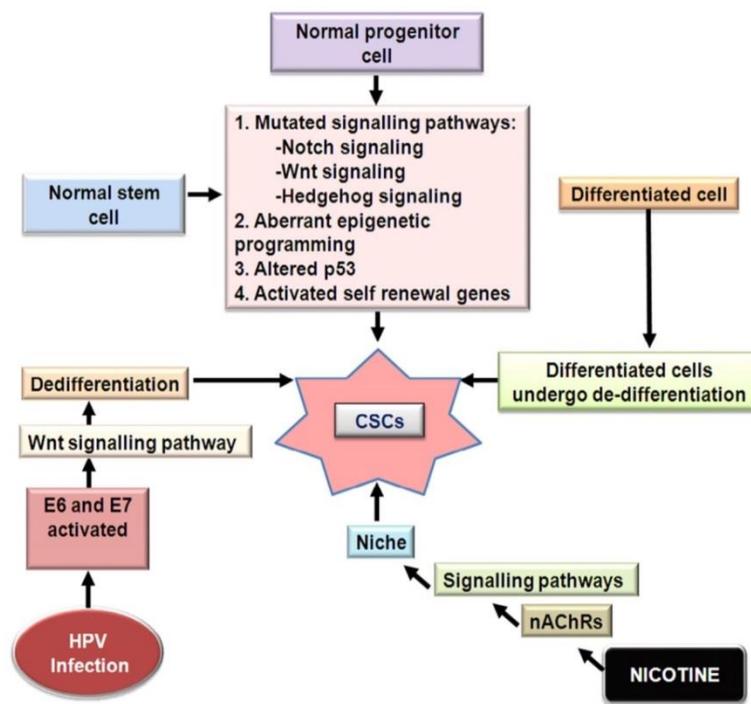


Fig. 17. Posible origen de las CSC del carcinoma oral.

Las células madre y células progenitoras normales, pueden sufrir mutaciones o aberraciones genéticas o epigenéticas provocando el origen de CSC. Además de la infección por VPH que puede activar la vía de señalización Wnt causando una des-diferenciación. Y por otro lado la nicotina y sus metabolitos creando un nicho de CSC a través de la manipulación de las vías de señalización.

Imagen adaptada de Sinha *et al*⁽²²⁾.

Las células troncales en carcinoma oral presentan las características generales mencionadas en el capítulo anterior.

✚ Evasión de la apoptosis.

Varios estudios han encontrado evasión de la apoptosis en líneas celulares específicas para CCECyC en donde se expresaban proteínas de la familia Bcl2 anti-apoptótica, del mismo modo se encontraron una mayor cantidad de células en fase G2/M con una disminución en los niveles basales de la apoptosis, también se demostró el silenciamiento de genes que son encargados de expresar moléculas pro-apoptóticas como Bax y caspasa-3⁽³²⁾.

Otro mecanismo de evasión de la apoptosis es la autofagocitosis que se ha relacionado con carcinomas oral. Se sabe que la expresión de Beclin1 lleva a la célula a vía de apoptosis, sin embargo estudios revelan que se encuentra inhibido Beclin1 en carcinoma de glándulas salivales así como en tejidos impregnados de tabaco, por lo que la célula utiliza la autofagocitosis para la supervivencia y mantenimiento de la viabilidad tumoral⁽³²⁾.

En el cáncer oral, la comprensión de los mecanismos celulares por los cuales se lleva a cabo la invasión y metástasis es fundamental para el desarrollo de diagnósticos y tratamientos, a través de marcadores celulares como CD44/CD133 y líneas celulares, se ha demostrado la capacidad de metástasis que tienen las CSC, por medio de la pérdida de la expresión de los genes encargados de la adhesión celular, la sobreexpresión de factores de crecimiento celular, proceso de transformación epitelio-mesénquima (EMT)^(32, 35). Figura 18.

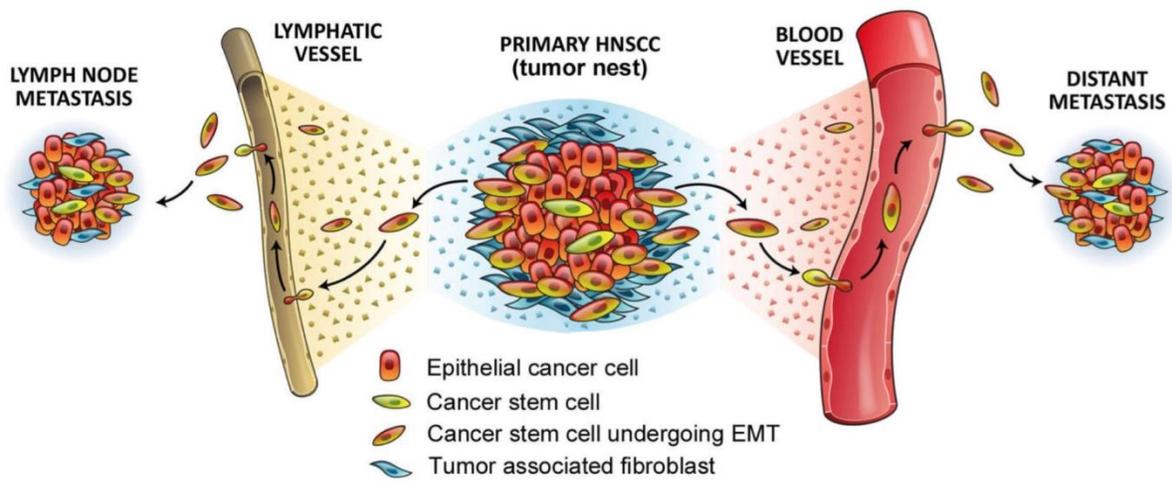


Fig. 18. EMT, CSC en carcinoma oral y metástasis.

EMT es el proceso por el cual las células epiteliales pasan al mesénquima. Las CSC orales migran a otros lugares a través de EMT que le permite hacer metástasis a los ganglios linfáticos (a través de los vasos linfáticos) y a sitios distantes como a los pulmones (a través de los vaso sanguíneos). La imagen también nos muestra los diferentes tipos de células que componen a un carcinoma oral.

Imagen modificada de Zhang *et al*⁽²⁴⁾.

✚ Resistencia al tratamiento.

Actualmente la quimioterapia y la radiación en el cáncer oral se centra en una citorreducción indiscriminada, por lo tanto, las CSC están implicadas respecto al tratamiento del cáncer. Varios estudios sugieren que el cáncer podría ser tratado eficientemente, con la erradicación de las CSC, aunque no hay evidencias sustanciales de que las CSC del carcinoma oral tengan resistencia a la radiación o químicos, haciendo que la mayoría de las terapias sean ineficaces y exista una reincidencia del tumor, a pesar del tratamiento^(35, 36). Figura 19.

La sensibilidad de las CSC al tratamiento se mide, a través de la capacidad de formar modelos de esfera, actividad de ALDH y otros biomarcadores frente a una cierta variedad de fármacos y radiaciones⁽⁴⁴⁾. Por ejemplo: CD44+ (biomarcador de CSC) mostro una mayor viabilidad y supervivencia en comparación con CD44- después de un tratamiento de fármacos citotóxicos, como son 5-Fu, doxetacel, paclitaxel, cisplatino y carboplatino, además de recibir radioterapia. Por otra parte las CSC en carcinoma oral, se ha demostrado expresan altos niveles de las proteínas de transporte ABC dependientes de ATP, las cuales son capaces de transportar los fármacos fuera de la célula, eliminado su función. Las CSC orales están reguladas por diferentes tipo de transportadores ABC (ABCB1, ABCG2 y ABCB5), que le proporcionan quimiorresistencia al tumor, sin embargo aún las CSC siguen sin diagnosticarse y por lo tanto sin tratamiento específico, la hipótesis que la literatura sugiere como plan de tratamiento consiste en crear medicamentos específicos para las CSC, nicho y las demás células que conforman la masa tumoral⁽³²⁾. Véase figura 12.

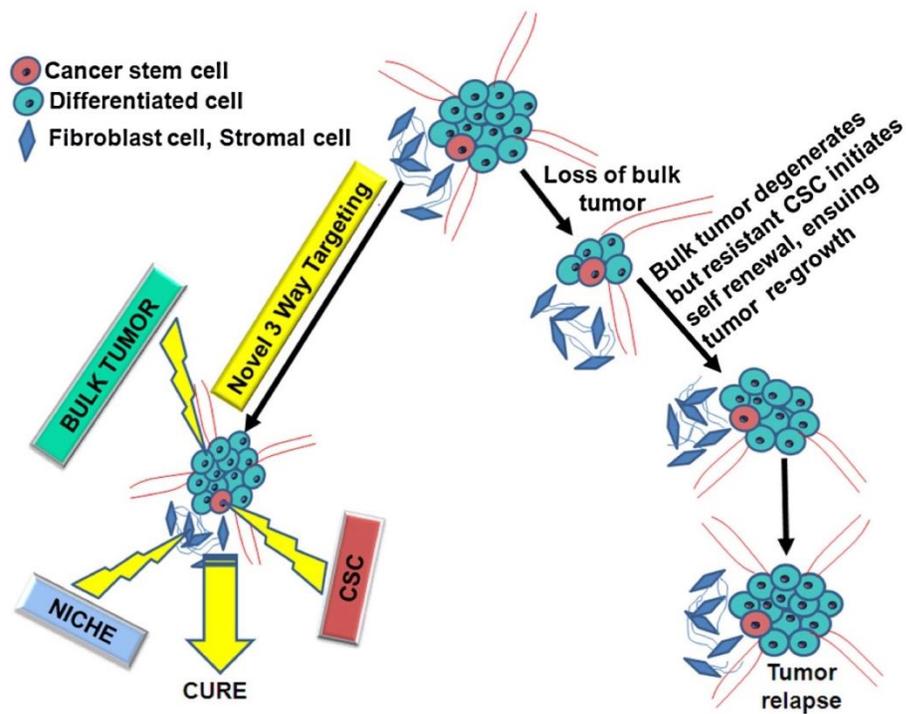


Fig. 19. Hipótesis de tratamiento eficaz para carcinoma oral.

La subpoblación identificada como CSC, permanece oculta sin diagnosticar, los tratamientos de citorreducción solo eliminan la masa tumoral, pero no a las CSC, ni su nicho, por lo tanto la estrategia del tratamiento consiste en combinar la eliminación de las células diferenciadas (población mayor de tumores) con las CSC resistente, así como destruir el nicho de las CSC que le dan supervivencia, está hipótesis se plantea para la erradicación completa del cáncer.

Imagen adaptada de Zhang *et al*⁽³⁰⁾.

2. CSC en CaCu.

El cáncer cervico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres de todo el mundo, este carcinoma es el resultado de un proceso de múltiples etapas, que implican la transformación del epitelio cervical normal, a una lesión intraepitelial pre-neoplásica que posteriormente puede transformarse a cáncer invasivo. Muchas investigaciones han demostrado la estrecha relación de CaCu con la infección de VPH-AR, el cual por medio de sus oncoproteínas E6-E7 anteriormente mencionadas conducen a la degradación e inactivación de p53 y pRB que interviene en el ciclo celular, proliferación y apoptosis^(25, 57, 58, 59). Debido a estudios recientes López *et al.* sugieren que la célula diana de la infección por VPH-AR son las células basales y la células madre de la región cervico-uterina. La células madre, a menudo persisten por largos periodos o incluso toda la vida en estado quiescente, en contraste con las células maduras en tejidos altamente proliferativos como son las células basales en la región cervico-uterina, que mueren después de cortos periodos de tiempo, este conocimiento hace proponer a los investigadores que es posible que un genoma viral persista en un estado latente en células que no se dividen por años, esto hace que aumente exponencialmente la oportunidad de acumular mutaciones (transformación a CSC) y podría explicar el prolongado periodo de latencia entre la infección viral y el desarrollo de CaCu. Finalmente, queda redactada la hipótesis de que las transformaciones neoplásicas se llevan a cabo por la infección de VPH-AR en las células madre y las infecciones productivas en las células basales^(25, 60). Figura 20.

Las células madre susceptibles a la transformación a CSC por infección de VPH-AR, se propone se encuentra en la zona de transición de ectocervix a endocervix (TZ), las cuales son finalmente responsables de la iniciación y mantenimiento del tumor, por sus procesos de división asimétrico y autorrenovación de las CSC^(25, 59). Véase figura 20.

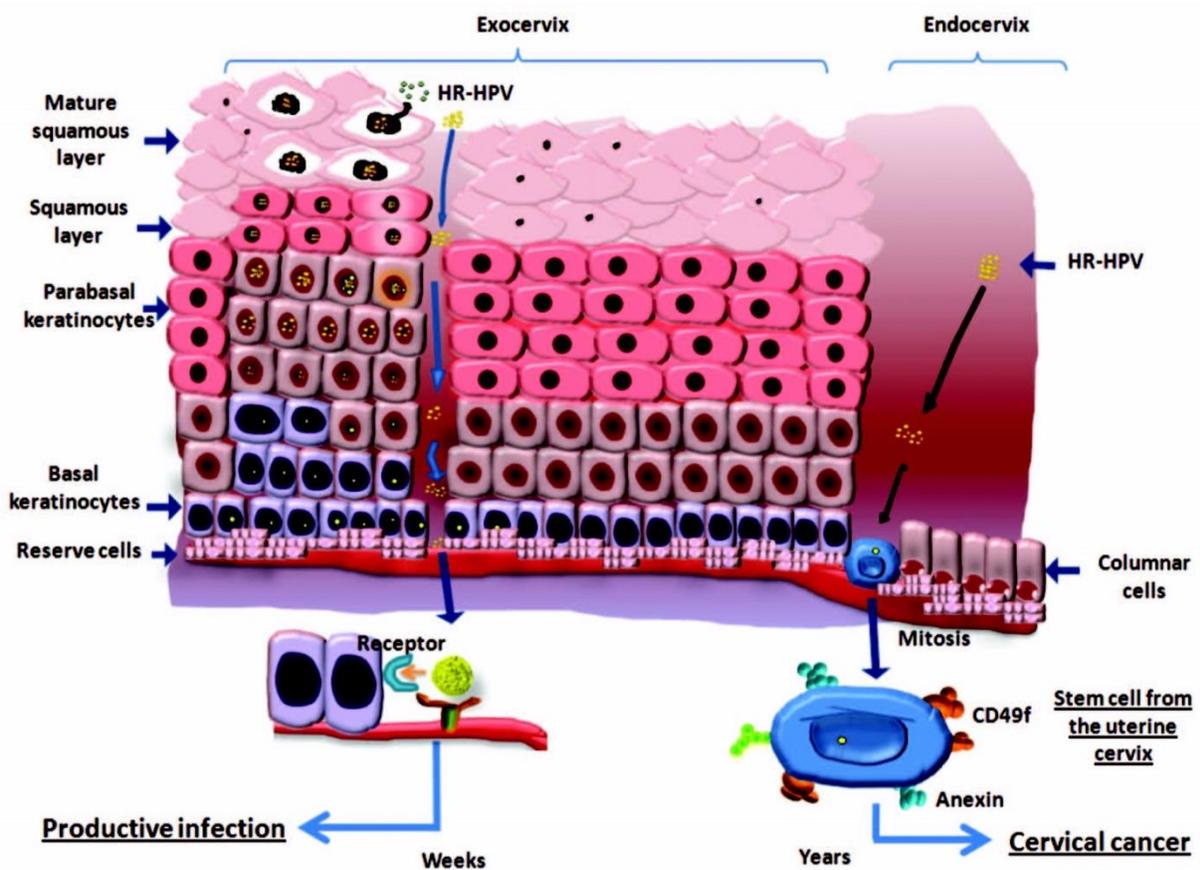


Fig. 20. Infección de VPH-AR en células basales y células madre del epitelio cervico-uterino.

Una de las regiones en donde se considera probable se localicen las células madre del cuello uterino es en la zona llamada TZ. Por otro lado se propone en la imagen que VPH-AR infectan a las células basales llevando a cabo una infección productiva en cuestión de semanas y en la célula madre provocando un carcinoma cervico-uterino en años.

Imagen adaptada de López *et al*⁽¹⁵⁾.

El proceso bien conocido de metaplasia escamosa, que ocurre en TZ del cuello uterino da lugar a células epiteliales columnares, así como a la regeneración epitelial escamosa, esta región sugiere un papel importante en la localización de las células madre. Los estudios morfológicos han demostrado que las células de reserva tienen características de indiferenciación, pluripotencialidad y metaplasia (capacidad de experimentar diferenciación escamosa) por lo que López *et al* a través, de una revisión de la literatura sugieren algunos biomarcadores para identificar a estas células de reserva, como células madre con características de troncalidad por infección de VPH-AR en CaCu. Los primeros biomarcadores descritos fueron p63 y citokeratina 17 (ck17) que se expresaron, en TZ y neoplasia intraepitelial (NIC) grados I, II y III. Otros estudios confirmaron que la inhibición de p63, está relacionada a la transición normal de las células epiteliales escamosas a columnares en el cuello uterino, en contraste con la expresión de p63 en una línea celular (MCF7) células madre de carcinoma de mama, en donde p63 provocó un aumento en la proliferación, clonogenicidad y crecimiento del cáncer, así como la formación del tumor en ratones inmunosuprimidos. También se encontró que en queratinocitos bien diferenciados, se encuentra en niveles bajos la expresión de p63, sin embargo en células epiteliales con VPH+ se encontraba expresado en altos niveles. Estos resultados sugieren que p63 podría ser un factor de transcripción iniciador de tumor de CaCu y que es uno de los posibles marcadores de CSC, en los tejidos epiteliales. Por otra parte, también se encontró la expresión de genes como Nanog, NS y Ms1 en lesiones epiteliales cervicales de diversa gravedad y en CaCu, mediante análisis inmunohistoquímicos. Estos genes son altamente expresados en células madre y se ha encontrado que regulan negativamente la diferenciación, la proliferación y la división asimétrica en CSC⁽⁶¹⁾. Estos hallazgos indican que Nanog,

NS y Ms1 pueden estar implicados en la carcinogénesis del cuello uterino. Sox 2 y Oct4 son genes que codifican factores de transcripción expresado en varias fases del desarrollo embrionario, se ha demostrado tiene un papel importante en la oncogénesis del cuello uterino. ALDH-1 enzima desintoxicante, responsable de la oxidación del retinol en ácido retinoico, se ha encontrado expresado en carcinoma cervico-uterino, por lo que se sugiere también como marcador, para identificar a las CSC en CaCu^(25, 59, 60).

C. Discusión.

El virus del papiloma humano (VPH) ha sido ampliamente implicado como factor etiológico en el carcinoma oral y cervico-uterino, sin embargo las nuevas investigaciones lo han relacionado como posible promotor en el origen de las células troncales del cáncer (CSC), por lo que varios estudios sugieren dos posibles hipótesis, acerca de la transformación en CSC a través de la infección por VPH^(18, 25, 29, 62).

La primera de la hipótesis menciona que la célula diana para la infección viral, es la célula madre del tejido epitelial, siendo esta el sitio perfecto para que el genoma viral se encuentre en un estado de latencia, explicando el tiempo prolongado que ocurre, entre la infección por VPH y el desarrollo del carcinoma cervico-uterino^(25, 29, 60). López *et al* plantean que el tropismo del virus a las células basales, provoca lesiones productivas, y la especificidad a las células madre, dan origen al carcinoma cervico-uterino en cuestión de años.

Sinha *et al* también coinciden con la idea que es posible que el VPH de alto riesgo infecte a la células madre en el epitelio oral, porque consideran que tienen un mayor riesgo a adquirir mutaciones en los genes encargados de la división y supervivencia celular; esto debido a su baja tasa de proliferación y alta capacidad de autorrenovación. Además mencionan la segunda hipótesis que el origen de las CSC en carcinoma oral, también se debe a un proceso de des-diferenciación de las células progenitoras o de las células basales; ya que varios estudios muestran que VPH 16 activa la vía de señalización Wnt en las células basales, siendo este gen de crucial importancia en las características de troncalidad⁽³²⁾. Además la interacción de las oncoproteínas virales E6-E7, con los genes supresores pRB y p53 no solamente intervienen en el mecanismo de la carcinogénesis, sino que también, pueden

desempeñar un papel importante en la plasticidad celular y en las características de troncalidad⁽²⁹⁾. Jain *et al* y Hong *et al* destacan el papel que juega p53 con la capacidad de pluripotencialidad de las células madre embrionarias, utilizando una línea celular de humanos y ratones, en donde comprobó que la inhibición de este gen, reprogramaba eficientemente la pluripotencialidad de la célula. En el caso del gen pRB, cuando se encuentra inhibido demuestra un papel crítico en la reprogramación y diferenciación celular demostrado por Calo *et al*^(29, 30, 55).

Ciufa *et al* coinciden en las dos hipótesis sobre el origen de las CSC, mencionan que además de la infección por VPH, las mutaciones genéticas o epigenéticas causadas en las células madre (totalmente indiferenciadas), las células progenitoras (parcialmente diferenciadas), o en células somáticas (diferenciadas), pueden impactar considerablemente en el proceso de transformación de estas células a CSC. Posteriormente en la célula somática sucede un proceso de desdiferenciación, adquiriendo características de autorrenovación y pluripotencialidad^(18, 26, 27). Otros estudios involucran a los factores de transcripción: Oct4, Sox2 y Nanog en el proceso celular anteriormente mencionado. Yu *et al*. demostraron que la sobreexpresión de los genes encargados de estos factores de transcripción provocaban en las células, la capacidad de pluripotencialidad una de las características principales de troncalidad, a través de una línea celular llamada "induced pluripotent stem cell" (iPSCs), obtenidas a partir de fibroblastos de ratón^(41, 46). Además Zhang *et al* y Sinha *et al*. describen como posibles biomarcadores para la detección fenotípica de CSC en carcinoma oral, a estos factores de transcripción (Oct3, Sox2 y Nanog), a las proteínas de membrana CD133 CD44, así como la actividad de la enzima ALDH^(18, 32, 35, 44). Por otro lado, con respecto a los

biomarcadores específicos para CSC en carcinoma oral Fulawa *et al.* mencionan, que no existen biomarcadores universales para CSC y que es un error común, suponer que el fenotipo de CSC es idéntico o similar en otro tipo de tumor, no obstante hace mención de los biomarcadores anteriormente descritos para identificar a las CSC⁽⁴⁴⁾. Además del uso de formación de esfera que simula las condiciones en las que se encuentran las células neoplásicas dentro del cáncer y la xenotransplatación en ratones inmunosuprimidos.

Con respecto a esta controversia se hace necesario mencionar que Tang *et al* en la universidad de Michigan desarrollaron una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, para la identificación de CSC, nombrada UM SCC-104. En donde, no solo identificaron a CSC, sino que determinaron su positividad en la infección por VPH 16. De tal forma que el propósito de esta línea celular, fue utilizarla como un recurso de investigación para asociar a estos dos factores (VPH+ y CSC), contribuyendo a la formación del carcinoma oral⁽⁵⁶⁾. De acuerdo a la revisión bibliográfica que se realizó en el presente trabajo, coinciden en que la infección por VPH tiene un papel importante, en el origen y mantenimiento de las características de las CSC, así como del pronóstico y futuros tratamientos en contra de carcinoma oral y cervico uterino^(25, 32, 35, 60).

En base a esta nueva línea celular UM SCC-104, se hace necesario sugerir la realización de nuevas investigaciones que incluyan a UM SCC-104 y el modelo de esfera; el cual puede ser un recurso importante para la simulación de las condiciones en las que se encuentra el carcinoma oral in vivo a través de la línea celular. Estos estudios permitirían la resolución de hipótesis que surjan de nuevos cuestionamientos en torno a la interacción VPH-CSC.

D. Conclusiones.

- ✚ El conocimiento de la fisiopatología viral del VPH, así como las características de las CSC, hace factible la hipótesis en la que se menciona que la infección de VPH-AR, podría estar relacionada con el origen de las CSC, debido a la sobreexpresión de genes involucrados en las características de troncalidad de las células neoplásicas.
- ✚ La línea celular UM SSC-104 derivadas del carcinoma oral, con CSC y VPH+ cultivadas en el modelo de esfera puede ser una herramienta valiosa, para el conocimiento y futuros cuestionamientos sobre estas tres variables (VPH+, CSC y cáncer oral), debido a que es un método de cultivo 3D in vitro que reproduce el microambiente tumoral.
- ✚ La relación de VPH-AR como factor etiológico del cáncer oral comprobado, y la posible presencia de CSC originadas por la infección de este virus, es un conocimiento de suma importancia para el cirujano dentista, a fin de llegar al entendimiento de uno de los procesos de carcinogénesis más actuales, que involucran a la cavidad oral, impactando en el área clínica y de investigación.

E. Referencias bibliográficas.

1. Egawa N, Ewaga K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015;7(38): 63–90.
2. Felix Beltrán J. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *CENIC ciencias biológicas*. 2014 May;45.
3. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Hausen H, De Villiers E-M. Classification of Papillomaviruses(PVS) on 189 PV types and Proposal of Taxonomic Amendments. *virology*. 2010 May 25;401(1):70–9.
4. Rocha A, Bologna R, Rocha C. Virus del papiloma humano y el cáncer de cabeza y cuello: revisión de la literatura desde México y Colombia. *Univ Odontol*. 2012 Jul;31(67):149–57.
5. Sánchez Piña P. Infección del virus del papiloma humano como un factor de riesgo para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *GAMO*. 2012 Jun;11(3):175–81.
6. De la Fuente -Villareal D, Guzmán -López S, Barboza-Quintana O, González- Ramírez RA. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*. 2010 Sep;12(49):231–8.
7. Benuto Aguilar RE, Berumen J. Virus oncogenicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Rev Mex*. 2009;53(5):234–42.
8. Zaldivar Leo de Larrea G, Martin F, Sosa Ferreira C, Ávila Morales J, Lloret M, Román M. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *REV CHIL OBSTET GINECOL*. 2012;77(4):315–21.
9. García T, García E, González J., Illueca C, Aznar E, San Juan M. Análisis de las coinfecciones mixtas por el virus del papiloma humano(VPH) de alto y bajo riesgo en lesiones de significado incierto. *Clin Invest Gin Obst*. 2013;42(1):18–24.
10. Murray RP. *Microbiología Médica*. 7a ed. España: Elsevier; 2013. 888 p.

11. Bruce A, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Introducción a la Biología Celular*. 3a ed. México: Panamericana; 2013.
12. Nelson D, Cox M, Cuchillo C. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3a ed. España: Omega; 2001. 1130-1133.
13. Bacardi R, Robaina C. Virus oncogénicos. *Rev Cubana Genet Comunit*. 2013;7(2):4–11.
14. Vega G, Ávila Morales J, García Solís P, Camacho N, Becerril A, Vega A. Infección por el virus del papiloma humano. *Biología Molecular. European Scientific Journal*. 2014;10(18).
15. Saha A, Kaul R, Murakami M, Robertson E. Tumor viruses and cáncer biology. Modulating signaling pathways for therapeutic intervention. *Cancer Biology & Therapy*. 2010;10(10):961–78.
16. Silva R, León D, Brebi P, Ili C. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30(2):186–92.
17. Martínez Sanabria I. Células Troncales de Cáncer (CSC) y las modificaciones epigenéticas involucradas en la carcinogénesis. *Ensayo de candidatura*. 2013 Feb.
18. Fulawka L, Donizy P, Halon A. Cancer Stem Cell- the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biological Research*. 2014;47:66.
19. Pierce B, Speers W. Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal:Prospect for Therapy by Directing Differentiation. *CANCER RESEARCH*. 1988;48:1996–2004.
20. Makino S. Further evidence favoring the concept of the stem cells in ascites tumors of rats. *Ann N Y Acad Sci*. 1956;63:818–30.
21. Lapidot T, Sirad C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caserescortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid-leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645–8.
22. Lu X, Mazur J, Lin T, Apella E, Xu Y. The Pluripotency Factor Nanog Promotes Breast Cancer Tumorigenesis and Metastasis. *Oncogene*. 2014 May 15;33(20):2655–64.

23. Conchrane C, Szczepny A, Neil W, Cain E. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2015;7:1554–85.
24. Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R, García A. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2012;25(3):107–15.
25. López J, Ruíz G, Organista J, Gariglio P, García A. Human Papillomavirus Infections and Cancer Stem Cells of Tumors from the Uterine Cervix. *The open Virology Journal*.6:232–40.
26. Panutti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, et al. Targeting Notch to Target Cancer Stem Cells. *Clinic Cancer Res*. 2015 Sep;16(12).
27. Ciufa K, Ribeiro D. Cancer stem cell: a new approach to tumor development. *Rev Assoc Bras*. 2015;61(1):86–93.
28. Joinli EC E. Consent for pluripotent cell use or Therapy. *Curr Stem Cell Rep*. 2015;1:92–101.
29. Iacovides D, Michael S, Achilleos C, Stratis K. Shared mechanisms in stemness and carcinogenesis: lessons from oncogenic viruses. *Frontier in cellular and Infection Microbiology*. 2013 Dec;3(66):1–6.
30. Jain K, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarec R, Zwaka T, et al. p53 Regulates Cell Cycle and MicroRNAs to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cell. *PLoS Biology*. 2012 Feb;10(2):4–16.
31. Chiche A, Moumen M, Petit V, Jonkers J, Medina D, Deugnier M, et al. Somatic Loss of p53 Leads to stem/progenitor cell Amplification in Both Mammary Ephithelial Compartments, Basal and Luminal. *Stem Cells*. 2013;31:1857–67.
32. Sinha N, Mukhopadhyay S, Nandini D, Kumar P, Buthia S. Review . Relevance of cancer iniating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oncology*. 2013;49:854–62.
33. Sánchez C. Conociendo y Comprendiendo la célula cancerosa :Fisiopatología del cáncer. *RevMedClinCondes*. 2013;24(4):553–62.

34. Zhang J, Espinoza L, Kinders R, Lawrence S, Pfister T, Zhou M. Nanog Modulates Stemness in Human Colorectal Cancer. *Oncogene*. 2013 Sep 12;32(37):4397–405.
35. Zhang Z, Sant M, Filho A, Nör J. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012 Enero;48(1):1–9.
36. Liu H, Lu L, Yang K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. *Am J Cancer Res*. 2015;5(3):880–93.
37. Cappaccione K, Pine S. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*. 2013 Apr;0(0):1–11.
38. Katz Y, Li F, Lambert J, Sokol E, Tam W, Cheng A, et al. Musashi proteins are post-transcriptional regulator of the epithelial-luminal cell state. 2014;3:1–27.
39. Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T. Tumorigenesis and Neoplastic Progression. Abundant Nucleostemin Expression Supports the Undifferentiated Properties of Germ Cell Tumors. *The American Journal of Pathology*. 2013 Aug;183(2).
40. Tsai R. Turning a new page on nucleostemin and self-renewal. *Journal of Cell Science*. 2014;127:3885–91.
41. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakawaga M. Suppression of Induced Pluripotent Stem Cell Generation by the p53-p21 Pathway. 2009;460(7259):1132–5.
42. Conklin J, Sage J. Keeping an eye on retinoblastoma control of human embryonic stem cell. *J Cell Biochem*. 2009 Diciembre;108(5):1023–30.
43. Villanueva J, Ponciano A, Ortiz E, Garrido E. Side populations from cervical –cancer –derived cell lines have stem-cell-like properties. *Mol Biol Rep*. 2014;41:1993–2004.
44. Han J, Fujisawa T, Husain S, Puri R. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:2–11.
45. J Y, MA V, Otto S, Bourget A, JL F, S T, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *SCIENCE*. 2007;318:1917–20.

46. Buganim Y, A Faddah D, Jaenish R. Mechanism and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet.* 2013 Jun;14(6):427–9.
47. Létourneau I, Quinn M, Wang L, Portelance L, Caceres K, Cyr L. Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2012;2-16.
48. Kimlin L, Casagrande G, Virador V. In Vitro Three-Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. *Molecular carcinogenesis.* 2012;52(157):167–82.
49. Sirenko O, Mitlo T, Hesley J, Luke S, Owens W, Cromwell E. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. *ASSAY and Drugs Development Technologies.* 2015 Sep;13(7):402–214.
50. Michael S, Lambert F, Strati K. The HPV16 oncogenes cause aberrant stem cell mobilization. *Virology.* 2013 Sep 1;443(2):218–25.
51. Martínez G, Reséndiz A, Reyes A. Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Epidermoide de la cavidad oral en pacientes mayores de 18 años. *CENETEC.* 2010;
52. Gallegos Hernández JF, Paredes Hernández E, Flores Diaz R, Miniauro Muñoz G, Apresa García T, Hernández Hernández DM. Virus del papiloma humano asociado con cáncer de cabeza y cuello. *Cir Ciruj.* 2007;75:151–5.
53. Syrjänen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of Oncology.* 2010;21:243–5.
54. Souza G, D P, Kreimer A, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C. Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:1994–56.
55. Calo E, Quintero JA, Danielian P, Nedelcu S, Berman S, Lees J. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *nature.* 2010;466:1110–4.
56. Tang A, Davis S, Owen J, Graham M, Czerwinski M, Park J, et al. UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16 containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head Neck.* 2012 Oct;34(10):1480–91.

57. Liu W-K, Jiang XY, Zhang ZX. Expression of PSCA, PIWL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol.* 2010;155:657–63.
58. McLaughlin-Drubin E, Crum P, Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *PNAS.* 2011;108(5):2130–5.
59. Organista N, Gómez G, Gariglio P. Embryonic Stem Cell-specific signature in cervical cancer. *Tumor Biol.* 2014;35:1727–38.
60. López J, Valdez F, Cerbon M, Garcia A. Normal and cancer stem cells of human female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2013;11:1–9.
61. Canham M, Charsou C, Stewart J, Moncur S, Hoodless L, Bathia R, et al. Increase Cycling cell numbers and Stem Cell Associated Proteins as Potential Biomarkers for High Grade Human Papillomavirus+ve Pre-neoplastic cervical Disease. *PLoS One.* 2014;9(12).
62. Vargas V, Vargas V, Tovar J. Detección Primaria del cáncer cervicouterino. *Cirugía y cirujanos.* 2015;84:1–6.