



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Activación de la vía de señalización Notch en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas derivadas de la línea celular HeLa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Leny Palma Pérez Díaz

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
Dr. Alejandro García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Diciembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Activación de la vía de señalización Notch en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas derivadas de la línea celular HeLa

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez y el Dr. Alejandro García Carrancá en el laboratorio de Virus y cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Rosa Estela Navarro González	Instituto de Fisiología Celular

Se reconoce la asesoría técnica de los encargados de diferentes unidades de trabajo.

Q.F.B. Carlos Castellanos Barba	Unidad de citometría de flujo de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI)
Dr. Alejandro López Saavedra Biol. Miguel A. Ramírez Otero	Unidad de Microscopía del Instituto Nacional de Cancerología los citómetros de la RAI
Q.F.B. Damaris Priscila Romero Rodríguez	Unidad de Citometría del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Biol. Alejandro Aguilera Castrejón	Toma de fotografías de fluorescencia

Durante el tiempo que se realizó el presente trabajo fui beneficiario de la beca CONACYT No. 367637/550270.

Se reconoce el apoyo por parte de:

- La fundación Miguel Ángel Alemán A.C.
- El CONACYT a través de los proyectos 0253804 y 179894
- La Red temática de células troncales y medicina regenerativa (CONACYT).

Dedicatoria

A mi papá Oscar Pérez Trujillo quien me enseñó el amor por el conocimiento y la convicción de superarme como persona

A mi mamá Jovita Díaz Verdugo quien me continúa enseñando a ser una mejor persona día con día.

A César García Hernández por ser la persona que ha estado conmigo en diferentes momentos de este paso de mi formación, te amodoro.

*A la Universidad Nacional
Autónoma de México y al posgrado
de Ciencias Bioquímicas.*

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro García Carrancá por asesorarme y permitir desarrollar la parte experimental como teórica de la presente tesis en su laboratorio.

A la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez por la paciencia y perseverancia en la asesoría de esta tesis.

Agradezco a mi papá Oscar Pérez Trujillo Q. E. P. D., por aconsejarme siempre te tendré presente. Agradezco a mi mamá Jovita Díaz Verdugo por apoyarme en los momentos que más he necesitado, tu apoyo siempre ha sido esencial en los momentos más decisivos de mi vida y siempre me has ayudado a poner los pies en la tierra en los momentos difíciles durante todos estos años. Les agradezco a ambos por los valores que me han inculcado, por educarme e invitarme a superar día con día y por darme amor y cariño como no recibiré jamás.

A mis hermanas Tania Paola y Thalía Bibiana Pérez Díaz, ustedes serán por siempre espejos en mi vida, no sé quién sería yo sin su presencia, gracias por todos los momentos que hemos compartido, vamos por más.

A mis amigos Maritza, Thalía, Juanita y Santiago, espero siempre volver a verlos, son mi segundo grupo de hermanos.

A César y a su familia, Socorro Hernández Carreño, Luis Francisco García Mandujano y Luis Francisco García Hernández, son mi segunda familia es una serendipia haberlos conocido.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Mariel, Mike e Ivette porque nunca me había sentido más libre de expresarme que con ustedes, a Heriberto, Mau, Silvia, Carlos, Andrei (te lo prometí), Ro, Miriam, Rocío, Karen, Jake, Helga y a todos los que con su convivencia y apoyo me ayudaron a estructurar esta tesis, les agradezco infinitamente.

¿Y que otro fin puede tener la amistad sino brindar recibir o tener felicidad "with a little help of my friends"?

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	1
1. RESUMEN	3
1.1 Abstract	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Células troncales epiteliales	5
2.2 Células troncales cancerosas	9
2.2.1 Identificación de células troncales cancerosas	10
2.2.2 Factores que regulan las CSCs	14
2.3 La vía de Notch	15
2.3.1 Estructura y componentes de los ligandos y receptores de la vía de Notch	15
2.3.2 Activación de la vía de Notch	19
2.3.3 La señalización de Notch en <i>Drosophila</i>	22
2.3.4 La señalización de Notch en <i>C. elegans</i>	23
2.3.5 La señalización de Notch en el epitelio adulto de mamíferos	24
2.4 Genes regulados por la vía de Notch	27
2.5 Cáncer	29
2.5.1 Cáncer Cervico-Uterino (CaCU)	30
2.5.2 El virus de papiloma humano (VPH)	31
2.5.3 La línea celular de cáncer Cervico-Uterino HeLa	32
2.6 Notch y cáncer	34
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVO GENERAL	38
4.1 Objetivos específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39

5.1	Cultivo celular	39
5.2	Inhibición de la vía de Notch	39
5.3	Viabilidad celular y citotoxicidad	39
5.4	Ensayo de formación de esferas	40
5.5	Citometría de flujo	41
5.5.1	Viabilidad celular	41
5.5.2	Ensayo ALDEFLUOR®	41
5.6	Inmunoblot	42
5.7	Ensayos de clonogenicidad	43
5.8	Inmunofluorescencias	43
5.9	Análisis estadístico	44
6.	RESULTADOS	45
6.1	Enriquecimiento de células con características de troncalidad en cultivos de la línea celular HeLa	45
6.2	Activación de la vía de Notch en cultivos enriquecidos en células con características de células troncales de CaCU y en cultivos en monocapa.	47
6.3	Efecto de la inhibición de la vía de Notch sobre la población con características de células troncales cancerosas de HeLa.	51
7.	DISCUSIÓN	57
8.	CONCLUSIÓN	64
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Índice de figuras

FIGURA 1 DIFERENCIACIÓN DEL QUERATINOCITO.....	7
FIGURA 2 MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL TEJIDO EPITELIAL.	9
FIGURA 3 LIGANDOS DE LA VÍA DE NOTCH.....	17
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES NOTCH DE MAMÍFEROS.	19
FIGURA 5 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH.	21
FIGURA 6 EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y LIGANDOS Y EL PAPEL DE NOTCH EN EL MANTENIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EN DIFERENTES ORGANISMOS EUCARIOTAS.	26
FIGURA 7 GENES Y VÍAS QUE SON BLANCO DE NOTCH,.....	27
FIGURA 8. COMPARACIÓN DEL CARIOTIPO DE CÉLULA NORMAL CON RESPECTO AL CARIOTIPO DE CÉLULAS HELA.	33
FIGURA 9. DOS RESULTADOS POSIBLES A LA INFECCIÓN POR UN VPH DE ALTO RIESGO...	34
FIGURA 10 PORCENTAJE DE SUBPOBLACIONES ALDH ^{ALTO} EN CULTIVOS DE FORMACIÓN DE ESFERAS Y CULTIVOS EN MONOCAPA.....	45
FIGURA 11 EFICIENCIA DE FORMACIÓN DE COLONIAS A DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO DE FORMACIÓN DE ESFERAS Y EN MONOCAPA.	46
FIGURA 12 ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE NOTCH.....	47
FIGURA 13 CINÉTICA DE HES-1 EN CULTIVOS EN CONDICIONES DE NO ADHERENCIA.	48
FIGURA 14 CONTROLES DE INMUNOFLUORESCENCIA.	49
FIGURA 15 LOCALIZACIÓN DE NICD-1 EN CULTIVOS EN MONOCAPA Y ESFERAS DERIVADOS DE LA LÍNEA CELULAR HELA.	50
FIGURA 16 INCREMENTO DE NICD-1 NUCLEAR EN CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	51
FIGURA 17 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE NOTCH EN CULTIVOS EN MONOCAPA.	52
FIGURA 18 LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE NOTCH ELIMINÓ LA SUBPOBLACIÓN CELULAR CON ALTA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALDH.....	53
FIGURA 19 LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE NOTCH NO AFECTÓ LA VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS MANTENIDAS EN CULTIVOS DE FORMACIÓN DE ESFERAS.	54
FIGURA 20 DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD CLONOGÉNICA POR EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE NOTCH.	55
FIGURA 21 DISMINUCIÓN DE CÉLULAS CON NICD ^{ALTO} EN CÉLULAS INHIBIDAS CON LA VÍA DE NOTCH.	56

Lista de abreviaturas más frecuentes empleadas en el presente trabajo.

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Enzima Aldehído deshidrogenasa
CaCU	Cáncer cervico-uterino
CSC(s)	Células troncales cancerosas
CSL	Acrónimo de las proteínas CBF-1/Suppressor of Hairless/LAG-1
DEAB	N, N-Dietil-amino-benzaldehído
DMEM	Modificación del Medio Basal Medium Eagle (BME)
DTC	Células del extremo distal
ECD	Dominio extracelular (de una proteína)
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EpiSC	Células troncales epiteliales
GSC	Células troncales germinales
LDA	Ensayos de dilución limitante
NIC	Neoplasias intra-epiteliales cervicales
SFB	Suero fetal bovino
SP	Población lateral
VPH	Virus de Papiloma Humano
VHS	Virus del Herpes Simple
VP	Virus de papiloma
TAC(s)	Células de amplificación transitoria
T-ALL	Leucemia linfoblástica aguda de células T
TIC(s)	Células iniciadoras del tumor

1. Resumen

De manera normal existen diversos tipos de células troncales adultas que regulan el proceso de homeostasis de los diferentes tejidos que componen al cuerpo humano. Se ha propuesto que los cambios en las células troncales adultas que promueven su malignización pueden ser el inicio del cáncer, transformándolas en células troncales cancerosas (por sus siglas en inglés, CSCs), siendo éstas consideradas las células encargadas del inicio y mantenimiento del tumor. Existen diferentes características en común entre las células troncales normales y las células troncales cancerosas, una de ellas es la característica de auto-renovación la cual es la capacidad de una célula troncal, normal o cancerosa, de generar otra célula con las mismas características que la original. El proceso de auto-renovación se encuentra finamente regulado por diferentes factores, como las vías de señalización Wnt, Hedgehog y Notch. La vía de Notch es una vía de señalización que necesita de una célula que envía la señal, y una célula que recibe la señal.

En cáncer, la vía de Notch se ha asociado a procesos asociados con el inicio y desarrollo de una neoplasia. Nuestro grupo de trabajo previamente ha reportado la presencia de una subpoblación con fenotipo y capacidad tumorigénica similar a la de células troncales cancerosas en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer cervico-uterino (CaCU); sin embargo, las vías que regulan su proceso de auto-renovación aún no han sido descritas. En el presente trabajo identificamos una asociación entre la activación de la vía de Notch y cultivos enriquecidos en células con características de células troncales cancerosas (CSC) derivados de la línea celular HeLa, presentando una alta actividad de la enzima ALDH así como un mayor potencial clonogénico; además de esto, al inhibir la vía de Notch, con un inhibidor de la enzima gamma secretasa (una enzima esencial para la activación de la vía) se redujo el potencial clonogénico y el porcentaje de células con alta actividad de la enzima ALDH en los cultivos de cervo-esferas.

1.1 Abstract

There are different types of adult stem cells that regulate the process of homeostasis in the organs and tissues that make up the human body. The theory of cancer stem cells proposes that changes in Adult Stem Cells can induce malignant transform of stem cells into the cancer stem cells (for its acronym in English, CSC), being considered the cells responsible for tumor initiation and maintenance. There are different common features between normal stem cells and cancer stem cells reinforcing the theory of cancer stem cells. One is the Self-Renewal feature which is the ability of a stem cell, normal or cancerous, to generate another cell with the same characteristics as the original. The self-renewal process is finely regulated by various factors, among which are the Wnt signaling pathway, Hedgehog and Notch pathway. The Notch pathway is a way of juxtacrine signaling, needing the contact between two cells: a cell that sends the signal and a cell that receives the signal. Activation of the Notch pathway is highly context-dependent participating in different cellular processes: In addition to maintenance of stem cells, it also participates in various processes associated with the onset and development of carcinogenesis. Considering the Cervical Cancer (CC) as a case study for the activation of the Notch pathway, our group has previously reported that different cell lines of this type of carcinoma phenotype exhibit a subpopulation of cancer stem cells; however, the pathways that regulate the process of their self-renewal has not been described. In this work, we identify an association between the activation of the Notch pathway and maintenance of stem cells of cervical cancer in a cervosphere model by inhibiting the pathway.

2. Introducción

2.1 Células troncales epiteliales

En el cuerpo humano se mantiene un proceso regulado del crecimiento y regeneración de tejidos u órganos a lo largo del desarrollo normal del cuerpo o en respuesta a daños físicos. Esto ocurre principalmente por la acción de una reducida población de células troncales (SC por sus siglas en inglés de *Stem cells*) somáticas residentes en tales tejidos (Schultz & Sinclair, 2016). Las células troncales adultas se encuentran en diferentes órganos como el cerebro, músculo esquelético, sangre periférica, médula ósea, hígado, intestino, corazón, dientes, vasos sanguíneos y en la piel (Zare et al., 2014). Esta pequeña población celular se define como aquellas células indiferenciadas con extensa capacidad de auto-renovación que permite dar lugar a más células troncales normales y de diferenciación definida, es decir, se encuentran ligadas a generar únicamente el linaje, o en su caso linajes, apropiados para el tejido en donde reside (Morrison & Kimble, 2006). Por tanto, las células troncales adultas se consideran, dependiendo de la cantidad de linajes que generan, unipotentes o multipotentes, respectivamente (Lajtha, 1979; Watt and Driskell, 2010).

Similar al epitelio cervical, la unidad funcional del epitelio queratinizado es el queratinocito y la función que cumple en el cuerpo es ser una barrera física que protege al humano contra daños físicos y ambientales. Debido a su constante exposición a diversos daños, el epitelio mantiene un proceso de renovación y mantenimiento del tejido, lo cual la hace un modelo interesante para el estudio de las células troncales. Las células troncales epiteliales (EpiSC, por sus siglas en inglés *Epithelial Stem Cells*) reemplazan los queratinocitos que se pierden durante el recambio tisular o por muerte celular debido a daños. Los tres compartimentos de la dermis que pueden contener las posibles células troncales son la epidermis, la dermis y las terminales nerviosas. Toma y colaboradores reportaron que

únicamente las células de la dermis eran multipotenciales, debido a su capacidad de generar células en proliferación similares a lo encontrado en cultivos de toda la piel, mientras que en la epidermis se encuentran células troncales comprometidas únicamente al mantenimiento de ese tejido (unipotenciales) (Toma et al., 2001). Las células troncales se encuentran en una única capa basal que se encuentra adherida a una lámina basal; esta lámina proporciona un ambiente estructurado a las células troncales epiteliales, denominado nicho de las células troncales debido a que libera componentes de la matriz extracelular y provee a las EpiSC factores de crecimiento que mantienen su estado indiferenciado. Dependiendo de las necesidades del epitelio, se sabe que las células troncales de la capa basal se mantienen en estado de quiescencia (salen del ciclo celular a fase G_0 y no proliferan) o se comprometen a diferenciación dando origen a una célula progenitora, una célula indiferenciada que está comprometida a diferenciación y proliferación para dar origen a los queratinocitos diferenciados que se desplazarán hacia el exterior de manera columnar.

El queratinocito progresa en tres etapas de diferenciación: el estrato espinoso, granular y el estrato córneo (Figura 1). El paso clave de la diferenciación ocurre en la transición del estrato basal al espinoso, en este punto se apaga la expresión de los genes de las citoqueratinas (CK, por sus siglas en inglés) 5 y 14 mientras que se activa la expresión de las CK-1 y CK-10. La segunda transición ocurre del estrato granular al estrato córneo. Cuando el queratinocito se diferencia completamente, se encuentra en la parte superficial de la dermis, anucleado y empaquetado, eventualmente éstas células se pierden como escamas (Blanpain & Fuchs, 2009). El movimiento de renovación epitelial se denomina flujo epitelial alrededor de 1-2 semanas (Potten et al., 1987).

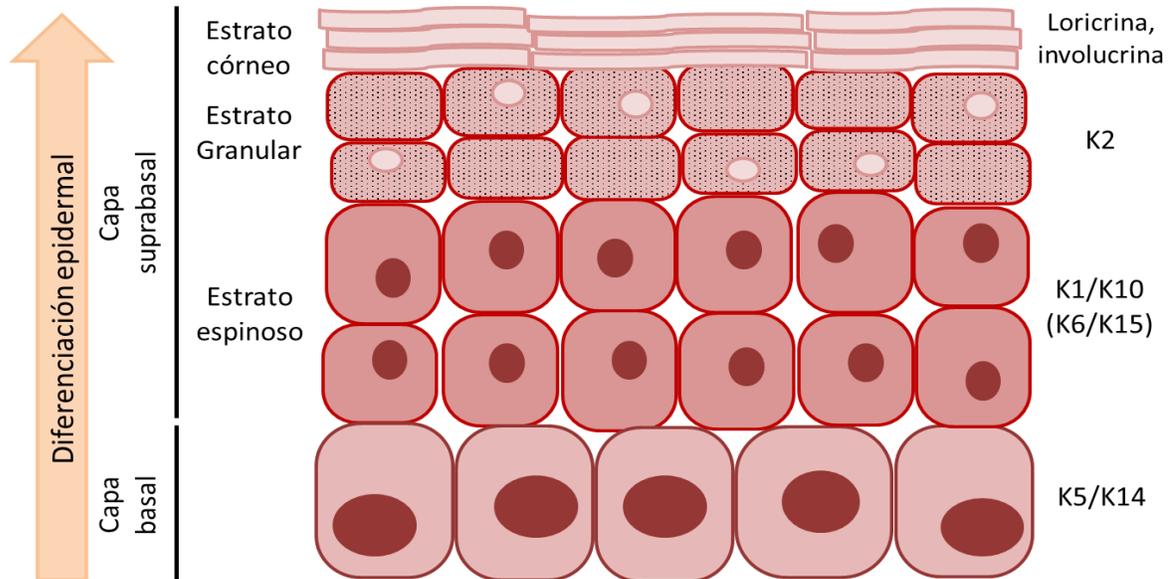


Figura 1 **Diferenciación del queratinocito.** El queratinocito se diferencia a través del epitelio expresando diferentes citoqueratinas hasta llegar a la parte externa como células queratinizadas anucleadas. Tomado de Proksch et al. (2009).

De manera normal, existe una reserva constante de células troncales epiteliales, las cuales se encuentran dispuestas en agrupaciones dentro de la capa basal y tienen una ubicación específica con respecto a las uniones dermo-epidermales. La identificación de las EpiSCs fue mediante el uso de integrinas. Watt y colaboradores (1998) evaluaron diferentes integrinas en células de la capa basal y observaron que las células que expresaban más integrina $\beta 1$ tenían mayor capacidad de formar colonias y con un mayor tamaño (Figura 2A), así como una rápida adhesión cuando se sembraban sobre proteínas de matriz extracelular con respecto a las células que tenían una baja o menor expresión de dicha integrina, las células con baja capacidad de adhesión solo generaban colonias más pequeñas (Watt 1998). Con estos resultados se apoya la teoría en la cual se propone que la división de la EpiSC dentro de la capa basal de la epidermis se da en pequeños grupos o unidades de proliferación, las cuales consisten de células troncales de ciclaje lento, que dan origen a alrededor de 10 células de amplificación transitoria (TACs por las siglas en inglés de *Transit amplifying cells*) de vida corta, con alta expresión de la integrina $\beta 1$; la teoría también propone la existencia de gradientes de integrinas dentro de la capa basal que puedan definir la existencia de un micro-

ambiente para el mantenimiento de las células troncales. Posterior a esta amplificación, se separan de la capa basal para generar unidades de columnas ascendentes de células con diferente grado de diferenciación (Clayton et al., 2007; Hsu et al. 2014).

Una hipótesis adicional fue propuesta por Mascré y colaboradores (2012), quienes emplearon ratones transgénicos marcados por CK14-YFP (Citoqueratina 14 marcada con la proteína amarilla fluorescente), de manera que podían rastrear pequeñas agrupaciones de células de la capa basal. Al seguir el patrón de crecimiento en las primeras semanas encontraron que en el 40% de las clonas marcadas la mayoría de las divisiones resultaban en una célula basal y una célula supra basal, lo que fue asociado con una división perpendicular a la capa basal. El otro 60% de clonas supervivientes se expandían basalmente, indicando una división paralela a la capa basal. En semanas posteriores, observaron que el 80% de las divisiones eran asimétricas, manteniéndose dentro de la capa basal, aproximadamente otro 10% mantenían una división simétrica generando solo EpiSC mientras que el otro 10% sólo generaba TACs (Figura 2B). Cuando la expansión clonal se desacelera, las EpiSCs vuelven a la quiescencia, mientras que las TACs proliferan y se diferencian de una manera estocástica. Esta hipótesis (denominada hipótesis PAS, por sus siglas en inglés, *Populational Asymmetry with Stem cells*) es la única que logra explicar diferentes resultados obtenidos en el rastreo celular de estudios previos, lo que no logra la teoría anterior (Li et al., 2013).

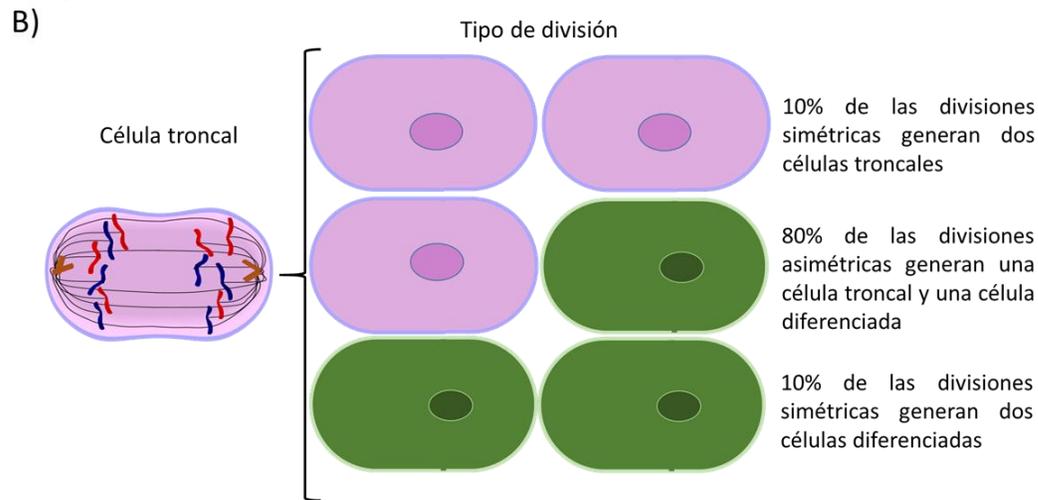
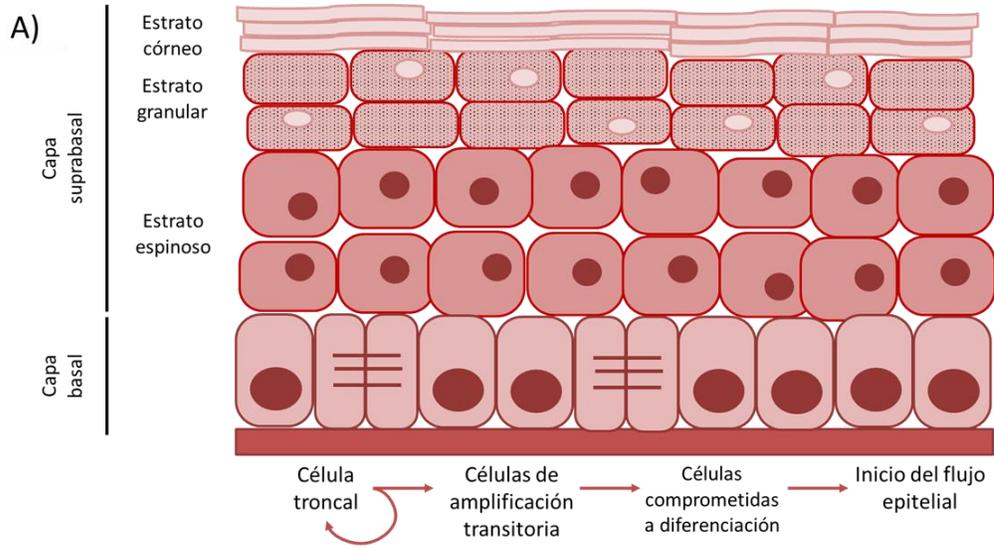


Figura 2 **Mantenimiento de la homeostasis del tejido epitelial.** A) Generación de las TACs para regenerar el tejido epitelial Tomado de Janes & Watt (2006). B) Dinámica de las células troncales epiteliales (EpiSCs) propuesta por Mascré et al. (2012).

Diversos autores proponen que el desarrollo e inicio de la carcinogénesis se da en la transformación de las células troncales adultas. La teoría de las células troncales cancerosas (CSCs, por las siglas en inglés de Cancer Stem cells) trata de explicar el origen general de las neoplasias.

2.2 Células troncales cancerosas

La teoría de las células troncales cancerosas propone que dentro de un tumor existe una organización definida jerárquicamente, en la cual, una subpoblación de células, las CSCs,

se encuentra en el ápice de la jerarquía. Se considera que las CSCs son las únicas células tumorigénicas y en consecuencia las responsables de generar la diversidad celular que conforma la masa tumoral. La denominación de células troncales indica que estas células poseen características que les proporcionan habilidades de tipo troncal que se comparten con las células troncales normales como la capacidad de auto-renovación, confiriéndoles mayor longevidad y la capacidad de diferenciación, aunque de un modo aberrante. Las CSC son resistentes a la radiación y la quimioterapia, debido a una mayor respuesta al daño al DNA (Bao et al., 2006), su baja tasa de proliferación, manteniendo un estado de quiescencia (Canter et al., 2016) y su incrementada expresión de transportadores ABC (Feng et al., 2009). Por otro lado, no comparten la propiedad de homeostasis la cual es la habilidad de balancear el proceso de diferenciación y auto-renovación de acuerdo a los estímulos externos; la pérdida de control homeostático les permite sostener el crecimiento del tumor de manera continua (O'Brien et al., 2010; Visvader & Lindeman, 2008) y ser consideradas de igual forma células iniciadoras del tumor (TICs por las siglas en inglés de *Tumor-initiating cells*) (Tirino et al., 2013).

La teoría de las CSCs abre dos posibilidades: a) si sólo ciertas células cancerosas dentro de un tumor poseen el potencial tumorigénico, es posible aislar las CSCs con base en un fenotipo específico que las diferencie del resto (Dalerba et al., 2007; Tirino et al., 2013) y b) debido a la similitud entre las células troncales normales y las CSCs (comparten la capacidad de auto-renovación y de diferenciación), es probable que las CSCs empleen vías de señalización, factores de transcripción, que se expresan en las células troncales adultas para regular su desarrollo (Reya et al., 2001).

2.2.1 Identificación de células troncales cancerosas

Las investigaciones iniciales para la identificación y aislamiento de las CSCs se dirigieron principalmente a la detección específica de las CSCs a partir de marcadores de superficie que las permitiera discriminar del resto de la población celular (Mao et al., 2009;

Tirino et al., 2013). A pesar de esto, la búsqueda de marcadores continúa desde que Bonnet propusiera los primeros marcadores de superficie de las CSCs (Bonnet & Dick, 1997), la razón de esto es que no existen marcadores universales de CSCs en tumores sólidos ampliamente aceptados; en la Tabla 1 se muestran diversos conjuntos de marcadores propuestos para la identificación de un tipo de cáncer, mientras que en otros tipos de cáncer solo se propone un marcador.

Tabla 1. Marcadores de superficie propuestos para la identificación de CSCs. Revisado por O'Brien et al., (2010).

Tipo de tumor	Marcadores usados para identificar CSCs
Leucemia mieloide aguda	CD34 ⁺ CD38 ⁻
Mama	CD44 ⁺ CD24 ⁻
	ALDH ⁺
	CD133 ⁺
Cerebro	CD133 ⁺
Próstata	CD44 ⁺ α 2 β 1 ^{High} CD133 ⁺
Cuello y cabeza	CD44 ⁺
Colon	CD133 ⁺
	EpCAM ^{high} CD44 ⁺
	ALDH1 ⁺
Páncreas	ESA ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺
	CD133 ⁺
Pulmón	CD133 ⁺
Hígado	CD90 ⁺
Melanoma	ABC B5 ⁺
Ovario	CD133 ⁺

Las CSCs varían dependiendo del tejido de donde se origina el tumor por lo que, dependiendo del contexto celular donde se encuentren, es probable que tengan distintos requerimientos para su mantenimiento y crecimiento, lo que involucra una expresión diferencial tanto de glicoproteínas superficiales como de vías de señalización (Gu et al., 2011). La identificación de estos marcadores requiere una validación biológica que resulta un proceso largo y en muchas ocasiones no coincide con lo obtenido entre los diferentes grupos de investigación, por lo tanto, las estrategias de selección evaluando propiedades funcionales de las CSCs resultan ser de gran utilidad en tumores sólidos.

Además de los marcadores de superficie, las CSCs pueden ser identificadas *in vitro* y aisladas a través de diferentes metodologías, entre las que se encuentran la detección de la población lateral (SP, por las siglas en inglés de *Side Population*) mediante la identificación de células que son capaces de expulsar el colorante Hoechst 33342, la determinación de la capacidad de formación de esferas en suspensión en medio libre de suero, la evaluación de la alta actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Tirino et al., 2013), así como el potencial clonogénico, en donde se evalúa la capacidad de las células para crecer en medios semisólidos como el agar suave (Levenbook et al., 1985).

El ensayo de la identificación de la SP se basa en determinar una pequeña subpoblación celular que presentan transportadores ABC, los cuales se encargan de expulsar colorantes y fármacos de la célula. Las células que componen esta pequeña subpoblación tienen un patrón de tinción bajo del colorante de Hoechst 33342, observándose una población lateral del lado izquierdo dentro de un dot-plot, por citometría de flujo (Goodell et al., 1996), además de esto diversos estudios han demostrado que las células de la SP están enriquecidas en CSCs con capacidad tumorigénica (Patrawala et al., 2005) y células progenitoras de SC normales (Scharenberg, 2002). Otra evaluación ampliamente estudiada, y en algunas ocasiones considerado como un marcador universal de CSCs (Marcato et al., 2011), es la alta

actividad de la enzima ALDH (Tirino et al., 2013). La ALDH pertenece a la familia de enzimas involucradas en la detoxificación de aldehídos, participando en la reacción de retinol → ácido retinoico, así como en la biosíntesis del folato, aminoácidos, el metabolismo de la ciclofosfamida, entre otros. Esta actividad también permite metabolizar y detoxificar fármacos, lo cual confiere resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos. Kim y colaboradores asociaron la alta actividad de la enzima ALDH con una alta expresión de HIF2- α y Notch-1, en líneas celulares de cáncer de mama, observando una mayor cantidad de la proteína HIF2- α . Cuando inhiben la enzima ALDH, se observa una reducción de HIF2- α , mientras que cuando silencian HIF2- α en células con alta actividad de la enzima ALDH, se observa una reducción en la quimio- y radio- resistencia con respecto a su control (Kim et al., 2013). Dentro de esta familia, se ha reportado que la alta actividad de ALDH1 está asociada con las CSCs de varios tipos de cáncer, como el de colon (Huang et al., 2009), mama (Ginestier et al., 2007) y cervicouterino (Liu and Zheng 2013).

La propagación de células derivadas de tumores en condiciones de no adherencia por amplios periodos de tiempo se basa en la capacidad de las CSCs de formar colonias más eficientemente que las células diferenciadas (Pastrana et al., 2011). El ensayo de formación de colonias en cultivo de agar suave se emplea para evaluar el potencial clonogénico, en el cual se inicia con células individuales que son capaces de generar una colonia después de 21 días de incubación sin necesidad de anclaje. Otra evaluación clonal se basa en la clasificación de Barrandon y Green (1987), quienes reportaron tres tipos de morfologías: a) la holoclona, la cual es una colonia grande con un perímetro definido y liso, este tipo de clona está formado principalmente de células troncales; b) la meroclona, es un tipo de colonia que crece de manera progresiva, pero no alcanza el mismo tamaño de las holoclonas, están formadas tanto de células troncales como de células ya diferenciadas, por lo que presentan un perímetro rugoso y heterogéneo y finalmente c) la paraclona, es una colonia pequeña con bordes

irregulares, lo que implica que la proliferación ha parado y las células que la componen son células diferenciadas.

La prueba *in vivo* se considera la prueba de oro para la identificación de las CSCs, en donde se mide la capacidad de tumorigenicidad (Engel & Schou, 2006) realizando ensayos de diluciones limitantes (LDA, por las siglas en inglés *Limiting dilution assays*) (O'Brien et al., 2010). La tumorigenicidad se define como la habilidad de células viables de generar el crecimiento progresivo de nódulos tumorales en el sitio de inoculación y, en algunos modelos, en sitios distantes por metástasis que son inoculadas en modelos animales no responsivos inmunológicamente sobre un periodo de observación limitado (Appia, 2010).

2.2.2 Factores que regulan las CSCs

Además de los marcadores fenotípicos, las CSCs comparten con las SC normales vías de señalización y otros factores que regulan la troncalidad, auto-renovación, diferenciación y proliferación. Entre éstos se encuentran la epigenética, el microambiente o nicho, factores de transcripción como Oct-4, Nanog, Sox2 y diferentes vías de señalización, tales como la vía de Wnt, Notch, Sonic Hedgehog, BMP. Sin embargo, éstas vías se encuentran alteradas en cáncer teniendo una participación importante en la iniciación y crecimiento del tumor (Reya et al., 2001), así como en la regulación de las CSCs. Esto ha sido evaluado en diferentes tipos de cáncer como carcinoma de colon, meduloblastoma, cáncer de próstata (Ceder et al., 2008; Pistollato et al., 2010; Yeh et al., 2011).

Entre los factores presentados, la vía de Notch ha cobrado importancia, debido a los diferentes procesos celulares en los que se encuentra asociado como lo es proliferación, crecimiento, migración, diferenciación, apoptosis y mantenimiento del estado indiferenciado de las células troncales (Chiba, 2006; Dang, 2012; VanDussen et al., 2012).

2.3 La vía de Notch

La vía de Notch se identificó originalmente por Thomas Hunt Morgan a mediados de la década de 1920, quien identificó el primer alelo mutante del gen Notch en *D. melanogaster*. Morgan y su grupo identificaron ciertos alelos mutantes que en algunos casos resultaban mortales, mientras que otros resultaron en moscas con fenotipo característico: algunas moscas presentaban alas con muescas, Notch en inglés, por lo que se denominaron genes Notch (Zacharioudaki & Bray, 2014).

En la década de 1930, Poulson dio los primeros pasos hacia el estudio de la vía en procesos de diferenciación y mantenimientos de células troncales; describiendo que los embriones de moscas que no presentaban el gen Notch se desarrollaban normalmente en las primeras 4 horas; sin embargo, las moscas fueron incapaces de desarrollar dos de las tres capas germinales, el mesodermo y endodermo (Baker & Schubiger, 1996).

A principios de la década de 1980, Artavanis-Tsakonas hizo un análisis molecular sobre el gen Notch en *Drosophila*, llegando a identificar su secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos de la proteína Notch. Con la elucidación estructural de la proteína, Artavanis-Tsakonas propuso la función de la proteína Notch: participa en una cascada de señalización que transduce señales moleculares entre células vecinas. Investigaciones posteriores en otro modelo multicelular como es *Caenorhabditis elegans* sobre los ligandos demostraron la idea de comunicación inter-celular (Ver sección 2.3.4). Posteriormente, se determinaron las estructuras de los ligandos y receptores que participaban en la vía de Notch.

2.3.1 Estructura y componentes de los ligandos y receptores de la vía de Notch

La señalización de Notch es inducida por una familia de ligandos DSL, caracterizados por la presencia del dominio DSL (Delta, Serrate y Lag-2). Los ligandos se clasifican

basándose en la homología existente con los ligandos prototipos de *Drosophila* Delta y Serrate; las proteínas tipo Delta son tres, Dll1, Dll3 y Dll4 (por las siglas en inglés de Delta-Like ligand), mientras que las homólogas a Serrate se denominan Jagged, habiendo dos proteínas en mamíferos Jagged1 y Jagged2. Los ligandos DSL son proteínas transmembrana tipo 1 que comparten un arreglo común en el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés de extracellular domains). Los dominios ECDs se componen de un dominio NT (N-terminal), el dominio DSL seguido por el motivo DOS (acrónimo de las proteínas Delta y OSM-11-like proteins) y de 6 a 16 repeticiones en tándem del factor de crecimiento epidermal (EGF-like, por sus siglas en inglés de Epidermal growth factor-like), que se unen a calcio (Ca^{+2}). Los dominios DSL y DOS son importantes para las interacciones con Notch (D'Souza et al., 2010), los dominios NT se subdividen en dos regiones distintas de acuerdo al contenido de cisteína N1, rico en cisteína, y N2 que no contiene cisteína. Los dominios ECDs son altamente conservados, mientras que los dominios intracelulares (ICD por las siglas en inglés de *Intra-Cellular Domain*) presentan una menor homología en su secuencia. A excepción de Dll3, los dominios ICDs de todos los ligandos DSL contienen varios residuos de lisina que son sitios potenciales de modificación por la enzima E3 ubiquitin ligasa, un proceso esencial para la activación de Notch. Además de esto, algunos ligandos DSL tienen un dominio PDZ (Acrónimo de las proteínas PSD9, una supresora de tumores en *Drosophila*, DlgA y la proteína zonula occludens-1, ZO-1) en el C-terminal. En la Figura 3 se muestra la estructura lineal de los ligandos DSL.

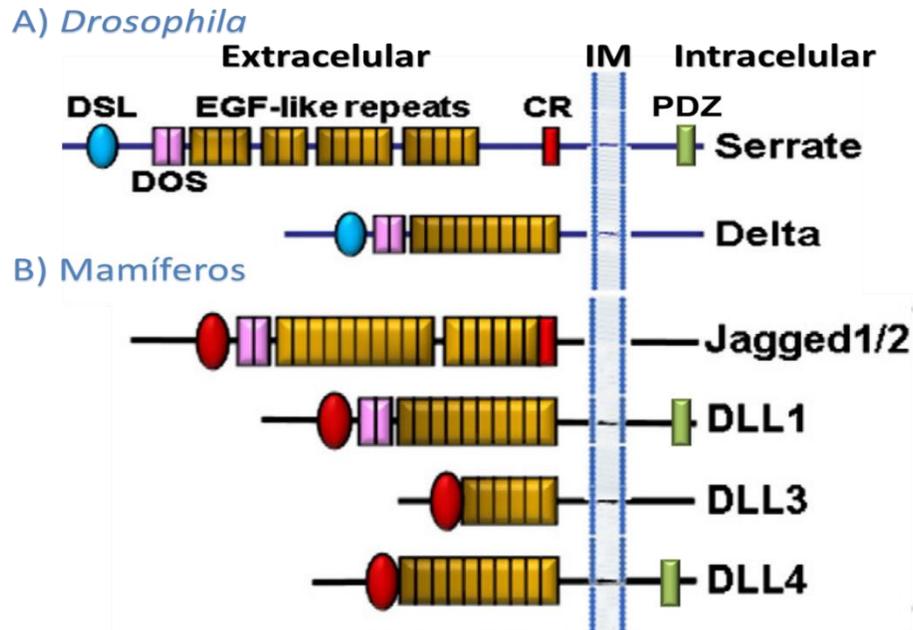


Figura 3 **Ligandos de la vía de Notch.** A) Estructura de los ligandos prototipo Notch de *Drosophila*. B) Estructura de los ligandos de la vía de Notch presente en mamífero. El dominio DSL y DOS participan en la unión con el ligando; CR: Región rica en cisteína; DLL1: Delta-like ligand-1; IM: región intermembranal; PDZ: Acrónimo de las proteínas PSD9, DlgA y ZO-1.

Los receptores Notch también son proteínas trans-membranales. La divergencia evolutiva de organismos vertebrados e invertebrados originó dos rondas de duplicación, las moscas, como *Drosophila*, poseen un único gen Notch, los gusanos, como *C. elegans*, tienen dos genes (LIN-1 y GLP-1), mientras que los mamíferos presentan cuatro genes. Los receptores Notch en mamíferos, son Notch-1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4, los cuales son procesados y activados a través de una serie de eventos proteolíticos después de la unión con su ligando (Kovall & Blacklow, 2010).

El receptor Notch maduro se compone de tres dominios, el dominio extracelular el cual media su interacción con sus ligandos, Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4 (DLL-1, DLL-3 y DLL-4), Jagged-1 y Jagged 2 (Jag-1 y Jag-2), el dominio intermembranal y el dominio citoplasmático o intracelular de Notch (NICD, por sus siglas en inglés de *Notch Intracelular domain*). El ECD consiste en: a) repeticiones en tándem de EGF-like en el dominio NT que son responsables para la unión con el ligando, el número de repeticiones en tándem EGF-like

varía entre especies y el subtipo de receptor (Dll o Jag) teniendo alrededor de 29-36, aunque para una interacción productiva con su ligando se requieren esencialmente las repeticiones 11 y 12 (Kopan & Ilagan, 2009); algunas repeticiones EGF-like se unen a Ca^{2+} , y *b*) una secuencia reguladora negativa (NRR, por sus siglas en inglés de *negative regulatory region*) que se compone de tres repeticiones ricas en cisteína LN (Acrónimo de las proteínas Lin12/Notch) que contienen sitios de unión a Ca^{2+} . Las repeticiones LN estabilizan la interacción entre las subunidades, previniendo una activación prematura del receptor independiente de ligando (Kovall & Blacklow, 2010).

La subunidad trans-membranal incluye una pequeña región extracelular y presentan un par de cisteínas altamente conservadas, que participan en la heterodimerización con el receptor, una región transmembranal tipo I y una región intracelular que contiene un módulo asociado a RBP-Jk (RAM, por sus siglas en inglés de *RBP-Jk association module*) que interactúa con su co-activador transcripcional CSL (Acrónimo de las proteínas CBF-1/RBP-Jk en ratones/*Suppressor of Hairless*/LAG-1) (Lubman et al., 2007). Esta subunidad también presenta siete repeticiones de anquirina (ANK, por sus siglas en inglés *ankyrin*) que interactúa con CSL y otros factores transcripcionales (Espinoza & Miele, 2013), dos señales de localización nuclear (NLSs por sus siglas en inglés de *nuclear-localization signals*) flanquean estas repeticiones ANK (Kovall & Blacklow, 2010), un dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés *transactivation domain*) que permite unir la parte extracelular con la transmembranal de manera no covalente (ver estructura en la Figura 4). El dominio TAD presenta una secuencia C-terminal PEST (Acrónimo de los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina) (Espinoza & Miele, 2013), que PEST contiene múltiples sitios de fosforilación importantes para la estabilidad de NICD y sirve para señalar una rápida ubiquitinación y degradación por proteólisis, por ello es difícil de detectar dentro del núcleo (Chillakuri et al., 2012).

Existen modificaciones post-traduccionales del ligando Notch que juegan un papel importante en la regulación de la señalización de Notch, dentro de los cuales destaca la glicosilación en el ECD de Notch. La o-glicosilación regula las interacciones con el ligando, definiendo con qué tipo de ligando se va a unir (Chillakuri et al., 2012) un análisis de estas modificaciones se encuentra revisado en el trabajo de Espinoza & Miele 2013.

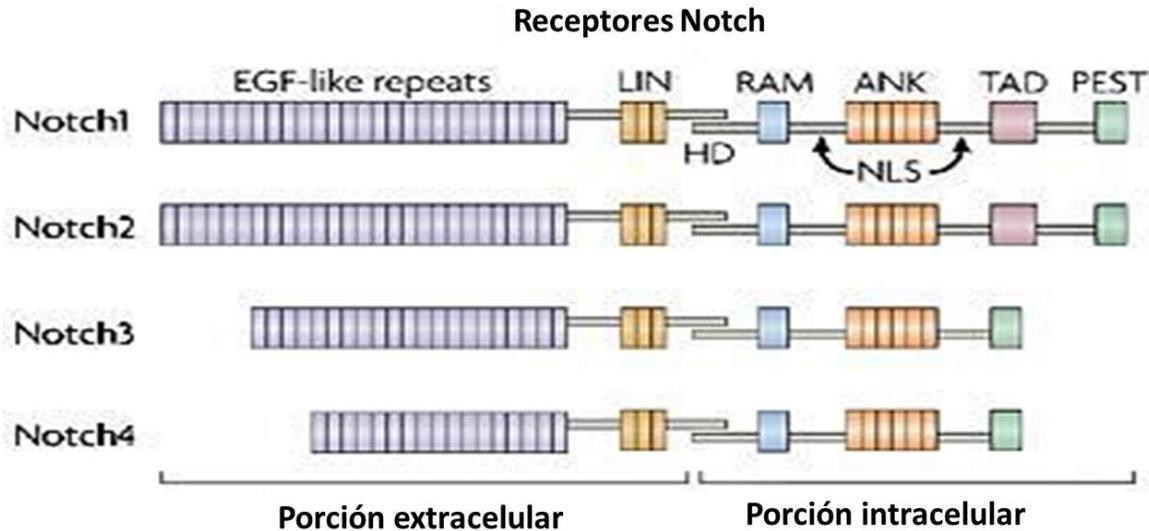


Figura 4 Estructura de los receptores Notch de mamíferos. En la figura se muestra la estructura de los receptores Notch 1-4. El receptor se compone de secuencias repetidas tipo EGF. LIN: Sitio de unión a Ca^{2+} , Acrónimo de las proteínas Lin12/Notch. RAM: Módulo de asociación a RBP-Jk ANK: Repeticiones de anquirina. TAD: Dominio de transactivación. PEST: Acrónimo de los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina Tomado de Osborne and Minter (2007).

2.3.2 Activación de la vía de Notch

La activación de la vía de Notch ocurre después del contacto célula-célula, siendo obligatorio que presenten una maquinaria independiente de procesamiento que asegure que ambas células tengan identidades distintas (Wang, 2011). Una célula presenta los ligandos Delta o Jagged, es decir envía la señal, mientras que la célula que recibe la señal presenta los receptores Notch 1-4 (Borggreve & Oswald, 2009). Esta interacción celular facilita la unión receptor-ligando e induce un cambio conformacional que hace susceptible al ligando Notch al corte por la enzima ADAM (por las siglas en inglés de *A disintegrin and metalloprotease*

domain) en el dominio extracelular (Talora et al., 2008). Este corte crea un intermediario que aún se encuentra unido a la membrana llamado NEXT (por las siglas en inglés de *Notch extracellular truncation*), que reconoce la enzima γ -secretasa, una proteasa dependiente de presenilina. La enzima γ -secretasa corta NEXT en el dominio intra-membranal, dejando a NICD libre para que sea translocado al núcleo, en donde forma un complejo de activación transcripcional con el factor CSL, convirtiéndolo de un represor transcripcional a un activador, adicionalmente recluta al co-activador *Mastermind-like* (MAML-1,-2 y -3 en vertebrados). El complejo CSL-NICD-MAML se ensambla en el DNA blanco y activa la expresión de genes blanco (Figura 5).

A pesar de que la activación de la vía de Notch es relativamente sencilla, sin segundos mensajeros, como el AMP cíclico en respuesta a la activación de receptores asociados a proteínas G, la activación de genes resulta compleja y en algunos casos, impredecible (Krejčí & Bray, 2007; Rand et al., 2000). Por tanto, la señal se puede amplificar de manera que puede controlar diferentes respuestas dependiendo del tejido y de la célula receptora, estando involucrada en procesos de proliferación, crecimiento, migración, apoptosis y diferenciación (Chiba, 2006; VanDussen et al., 2012), así como en procesos de diferenciación y regulación de células troncales, tanto cancerosas como no cancerosas, es capaz de dictar el destino final de una célula que está dirigida a diferenciación o al mantenimiento del estado indiferenciado de células troncales adultas de diferentes tejidos mediando el balance entre el proceso de diferenciación y auto-renovación (Bray et al., 2009; Xiao et al., 2009).

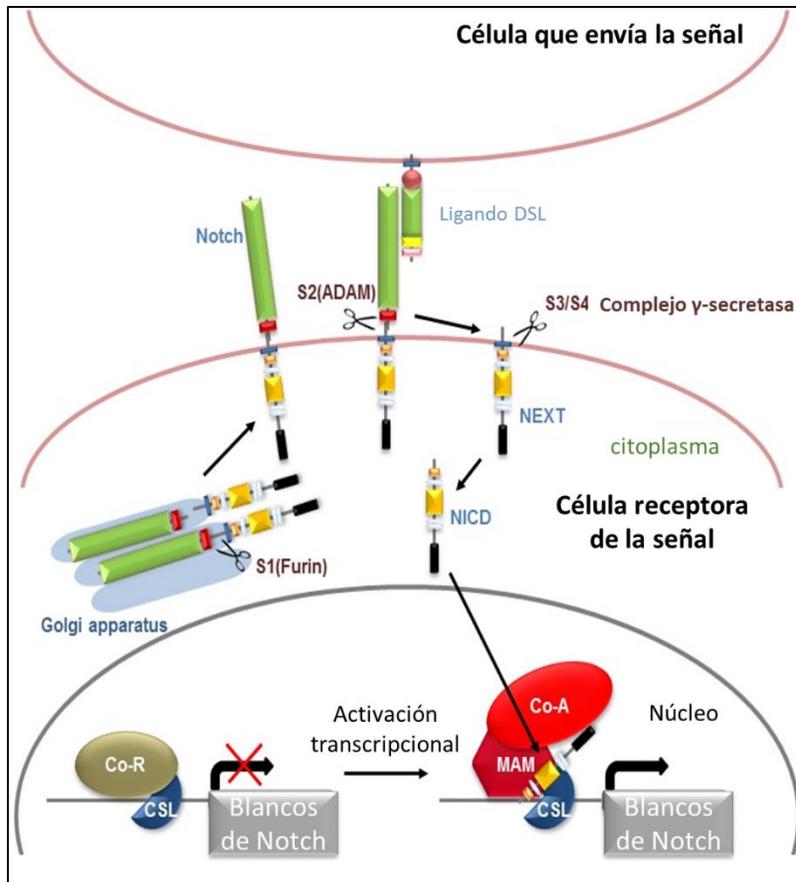


Figura 5 **Vía de señalización de Notch**. La interacción de dos células, una con receptor y la otra con ligando, lleva a la activación de la vía Notch. Esta involucra la enzima ADAM (por las siglas en inglés *A disintegrin and metalloprotease domain*), que reconoce un sitio de corte en la parte externa de la célula generando un intermediario que complejo gama secretasa corta para generar y liberar NICD del núcleo. NICD es el fragmento activo que tiene una señalización a núcleo lo que le permite hacer un complejo con CSL y MAML para el reclutamiento de otros activadores transcripcionales para la expresión de los genes blanco de la vía. Modificado de *Radtke and Raj (2003)* y *Kopan and Ilagan (2009)*.

Por ejemplo, la vía de Notch participa en el sistema hematopoyético en el proceso de auto-renovación de las células troncales hematopoyéticas y de las células progenitoras (Robert-Moreno, et al., 2005). En estudios con ratones que contienen mutaciones puntuales en NICD, Gerhardt y colaboradores (Gerhardt et al., 2014), observaron una disminución en la expresión de Hes-1, lo cual generó defectos en el desarrollo y supervivencia de células troncales hematopoyéticas (HSC, por las siglas en inglés de *Hematopoietic stem cells*).

En el sistema inmune, la activación de la vía de Notch influye en el proceso de desarrollo de los linfocitos y controla los estadios tempranos del desarrollo de las células T en el timo (Sandy & Maillard, 2009). Schmitt y colaboradores (2004) mostraron que solamente en cultivos de células doble negativas (son CD4⁺CD8⁻) del estroma que expresan Dll1 pueden pasar a otros estadios de desarrollo, células que no presentaban Dll1 fracasaban en su desarrollo. En estadios más avanzados, la vía de Notch también define el destino celular, Ng y colaboradores (2001) encontraron una expresión diferenciada entre poblaciones de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ con respecto a poblaciones de células T vírgenes, CD4⁺CD25⁻, expresando el primer grupo Notch-4, Delta1 y Hes-1. Maekawa y colaboradores (2003) mostraron que la activación de la vía de Notch en cultivos con cubiertas del ligando Delta1, inducía la diferenciación de células T a células Th1 de una forma dosis dependiente. Guiu y colaboradores (2013) asociaron la expresión de un blanco de la vía de Notch, Hes-1, con el mantenimiento de las células T.

Dos modelos dentro de biología del desarrollo clarificaron el mantenimiento de las células troncales por medio de la señalización de Notch: la ovogénesis de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y el mantenimiento de las células troncales germinales del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Estudios posteriores han permitido conocer la función de la vía de señalización en el tejido epitelial (Figura 6).

2.3.3 La señalización de Notch en *Drosophila*

El germario de *Drosophila* es la cámara donde se originan de dos a tres células troncales germinales (GSCs, *Germinal Stem Cells*), las cuales se localizan en el extremo anterior de los ovariolos. El nicho troncal está compuesto principalmente por tres a seis células somáticas (Bastock & St Johnston, 2008). La unión al nicho, mediante cadherinas, previene que cuando la GSC se divida asimétricamente la célula que continúa en contacto con el nicho mantenga su proceso de auto-renovación, mientras que la célula hija que se separa de las

células del nicho activa el programa de diferenciación para producir un ovocito maduro protegido por células nodrizas (Curtis & Schnek, 2008) (Figura 6A). Se ha demostrado que las proteínas que se encargan de mantener dentro del nicho el proceso de auto-renovación de las GSCs son las asociadas a la vía de Notch, para lo cual se necesita principalmente una célula que envíe la señal, es decir que presente el ligando como Delta o Serrate, que en este caso es la GSC y una célula que tenga el ligando Notch para que reciba la señal de activación, que es la célula somática del nicho (Xu & Gridley, 2012) (Figura 6A). Una sobreexpresión de un ligando de Notch, Delta, en las GSCs permite un incremento de hasta 10 veces el número de células somáticas del nicho; sin embargo, la vía es bidireccional, si existe mayor cantidad de células somáticas aumenta el número de GSC. Cuando no existe señalización de la vía de Notch, la GSC dejará el nicho y se diferenciará (Ward et al., 2006).

2.3.4 La señalización de Notch en *C. elegans*

Por otro lado, el nicho de las GSCs de *C. elegans* está estructurado básicamente por unas células mesenquimales denominadas células del extremo distal (DTC, *Distal tip cell*) las cuales flanquean a cada lado a una GSC, en el caso de los machos, para los nematodos hermafroditas, solo existe una DTC. La proliferación de las GSC en *C. elegans* se da en la región mitótica, dentro de la gónada distal. Cuando la GSC se divide, ambas células hijas tienen el mismo potencial de desarrollo, es el factor extrínseco, es decir la señalización mediada por el nicho como en el caso de *Drosophila*, lo que regula el destino final de las células hijas. La célula hija que se encuentre en contacto con el nicho, la DTC, permanecerá dentro de la región mitótica y continuará generando nuevas GSCs, mientras que la célula que se aleja de la DTC entra al ciclo celular meiótico y progresará para finalmente madurar como esperma u ovocito (Figura 6B). La señal que regula la proliferación es la activación de la vía de Notch. En este caso, la DTC es la que envía el ligando LAG-2 o APX-1, un homólogo del ligando Delta de Notch en *Drosophila*. Por otro lado, la GSC de *C. elegans* presenta el receptor

GLP-1, que es igualmente semejante a Notch en *Drosophila* (Wolpert, 2009). En *C. elegans*, la activación de Notch es suficiente para el mantenimiento de las células troncales, la pérdida de esta señalización elimina la auto-renovación de las GSCs, detiene su división mitótica y las dirige a meiosis para una posterior gametogénesis (Byrd & Kimble, 2009).

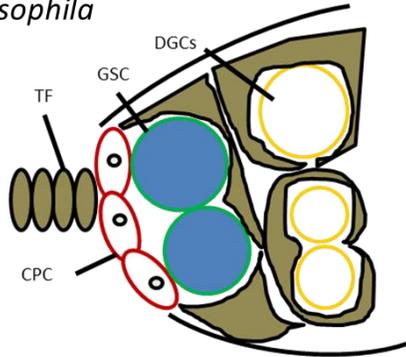
2.3.5 La señalización de Notch en el epitelio adulto de mamíferos

La vía canónica de Notch es uno de los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación de las células troncales epiteliales. El proceso de división asimétrica en el tejido epitelial depende de la maquinaria de polaridad regulando el posicionamiento del huso mitótico dependiendo de las necesidades del tejido. Durante el proceso de homeostasis la división asimétrica de las células troncales epiteliales adultas ocurre de manera paralela a la lámina basal, de manera que una célula hereda un determinante en el destino celular como Numb, un inhibidor de la activación de Notch, mientras que la otra célula que no tiene inhibida la señalización de Notch procede a una amplificación transitoria para posteriormente diferenciarse (Clayton et al., 2007). Además de la expresión de Numb, Lowell y colaboradores (2000) encontraron grupos de células únicamente en la capa basal que expresaban el ligando Dll-1. Cuando aislaron células troncales y TACs en cultivos de queratinocitos epidérmicos humanos, encontraron el doble de la cantidad mRNA de Dll-1 en células troncales con respecto a las TACs, mientras que en células ya diferenciadas no se pudo detectar; finalmente sugieren que la expresión de Dll-1 regula negativamente la maduración de las células troncales. Cuando un grupo de células sobre-expresaban Dll-1 en ciertos queratinocitos, las células vecinas se dirigían a ser TACs y posteriormente, a una diferenciación terminal, mientras que las células que sobre-expresaban Dll-1 proliferaban menos, manteniendo una mayor eficiencia de formación de colonias (EFC) con respecto a células que no sobre-expresaban el ligando Dll-1. Una explicación a esto consiste en un proceso que impide la translocación de NICD-1,

fragmento activo de Notch, al núcleo (Ceder et al., 2008), en donde las células vecinas a las que expresan Dll-1 eran negativas a Dll-1 y presentaban localización nuclear de Notch-1.

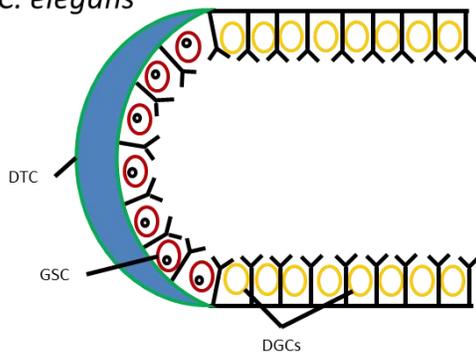
Los ligandos y componentes de la vía de Notch se encuentran expresados en la epidermis dependiendo del estado de diferenciación de los queratinocitos que la componen (Lowell et al., 2000) (Figura 6C). La mayoría de los estudios indican que los receptores de Notch se encuentran expresados en las células de la capa supra-basal. Notch-1 por ejemplo no fue detectado en tejido epitelial de próstata (Ceder et al., 2008), lo que indica que la vía de Notch en el epitelio se encarga de regular las células que están comenzando con el proceso de diferenciación terminal. Las células que se encargan de enviar la señal de activación de la vía son las células de la capa basal, expresando los ligandos de Notch Jagged 2 (Jag-2) principalmente, y en algunos casos Jag-1 o el ligando Delta-like ligand (Dll1). En la Figura 6 se muestra un resumen de la expresión de Notch de *C. elegans*, *Drosophila* y en el epitelio humano.

A) *Drosophila*



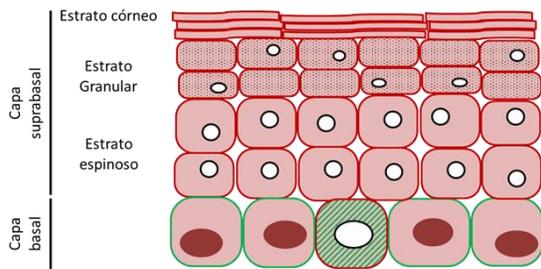
- GSC: Célula troncal germinal con el ligando Notch
- Célula del nicho con el receptor de Notch
- DGC: Célula germinal progenitora
- Expresión de genes blanco de la vía de Notch
- Células estructurales sin expresión de receptores o ligandos de Notch

B) *C. elegans*



- GSC: Célula troncal germinal con el receptor Notch
- Célula del nicho con el ligando de Notch
- DGC: Célula germinal progenitora
- Expresión de genes blanco de la vía de Notch

C) Epitelio de mamíferos



- Receptor Notch
 - Jagged-2
 - Jagged-1
 - Expresión de genes blanco de la vía de Notch
- } Ligandos de Notch*.

Figura 6 Expresión de receptores y ligandos y el papel de Notch en el mantenimiento y diferenciación de células troncales en diferentes organismos eucariotas. A) Activación de Notch en el nicho de las GSC en las gónadas hermafroditas de *Caenorhabditis elegans*. B) Activación de Notch en el nicho de las GSC en el ovario de *Drosophila*. C) Activación de Notch en la epidermis interfolicular neonatal de mamíferos. *En mamíferos existen otros ligandos como las proteínas DLL1 al DLL4 (por sus siglas en inglés Delta-Like ligand), en *C. elegans* el ligando es Lag-2, mientras que en *Drosophila* su homólogo es Delta. Las abreviaciones son por las siglas en inglés: CPC: Células de la cubierta; DGCs: Células germinales diferenciadas; DTC: Célula del extremo distal; GSC: Célula troncal germinal; TF: Filamento terminal. Adaptado de Chen et al., (2013) y Watt, et al., (2008).

2.4 Genes regulados por la vía de Notch

Como se mencionó en la sección 2.3.2, la activación de la vía de Notch involucra la unión con el factor transcripcional CSL y el co-activador transcripcional MAML con NICD. Los principales blancos de Notch son factores transcripcionales, como la familia Hes y Hey, los cuales son capaces de inducir un cambio en la expresión global de diferentes genes lo que explica el efecto de la vía de Notch en diferentes procesos celulares.

La expresión de los genes blancos se optimiza y especifica dependiendo de otros co-activadores que se unen al complejo CSL-NICD, al cual se denomina complejo de transcripción Notch. Aunque el análisis bioinformático de Cave y colaboradores propone un mayor número de blancos de Notch, más de los que se han validado experimentalmente, únicamente un pequeño grupo de genes blanco se expresarán mediante el complejo de transcripción Notch dependiendo del contexto y las necesidades de la célula (Cave, 2011) (Ver Figura 7).

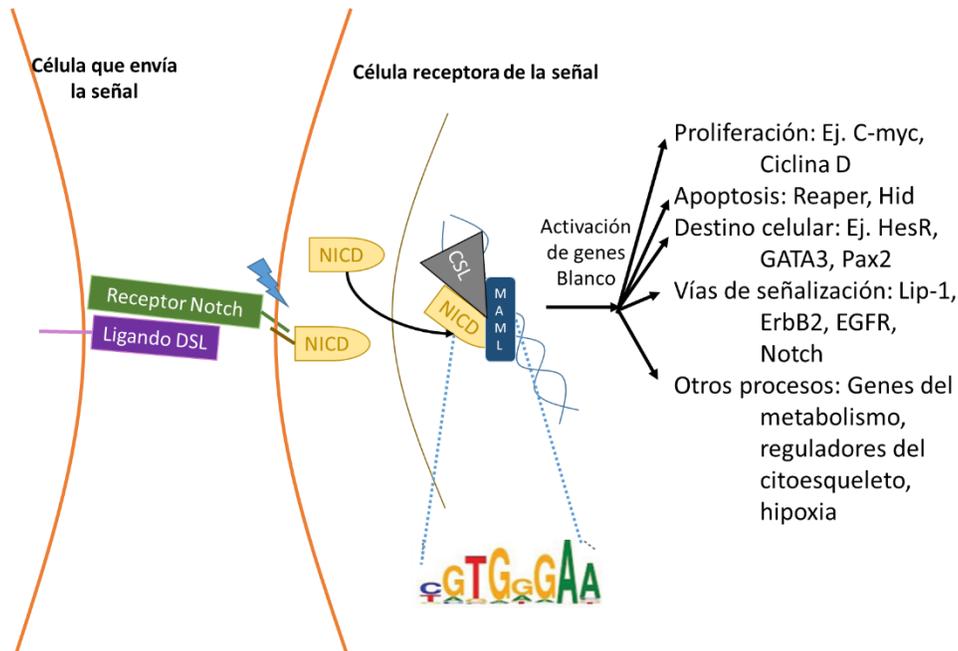


Figura 7 Genes y vías que son blanco de Notch, dependiendo del contexto y funciones celulares en las que participa la vía de Notch. Tomado de Bray and Bernard (2010).

Los blancos más caracterizados de la vía de Notch son la familia HES y Hey, represores transcripcionales de tipo hélice-bucle-hélice básico (bHLH, *basic Helix-Loop-Helix*) de genes. La proteína Hes presenta tres dominios que les confiere sus funciones de factores transcripcionales: el dominio bHLH, el dominio *Orange* y el dominio WRPW. El dominio bHLH tiene dos regiones, la región básica para la unión con DNA, y la región HLH para dimerización con otra proteína de la familia Hes. El dominio C-terminal WRPW reprime la transcripción reclutando co-represores homólogos de Groucho (represión activa) (Kageyama et al., 2008) y el dominio *Orange* regula la selección de las proteínas que conforman el heterodímero bHLH. Los represores HES se unen a secuencias consenso CACG(C/A)G o a la caja N, CACNAG, presentes en la región promotora de los genes blanco (Kageyama et al., 2007). Los factores Hes funcionan como homodímeros, aunque también dimerizan con otros factores bHLH, como Hey (por sus siglas en inglés *Hes-related with YRPW motif*) reprimiendo más eficientemente en comparación a los homodímeros. De la misma manera los represores HES también pueden dimerizar con activadores bHLH que se unen a cajas E (secuencia CAANNTG); sin embargo, estos heterodímeros no se pueden unir al DNA, ejerciendo un efecto dominante negativo sobre la expresión de genes con regiones promotoras con cajas E (represión pasiva). Existen 7 genes de la familia Hes, 1-7, los blancos más conocidos de Hes son Mash1 y E47.

La familia de genes HES/HEY puede cumplir con todas las funciones importantes de los procesos dependientes de la vía de Notch; sin embargo, esto no es suficiente para explicar las funciones de la vía (Bray & Bernard, 2010). En el epitelio se han identificado algunos blancos de la vía de Notch, como p21, el cual es necesario para el arresto del ciclo celular de los queratinocitos e iniciar el programa de diferenciación terminal en el estrato espinoso así como de la citoqueratina 1 (Rangarajan et al. 2001).

En cáncer se ha sugerido que un blanco esencial es c-myc (Weng et al., 2006), únicamente la desregulación de este factor transcripcional puede sustituir la función del

complejo de transcripción de Notch en la transformación y desarrollo de cáncer Cervico-Uterino (CaCU) y Leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*) (Subramanyam & Krishna, 2006; Weng et al., 2006). Un análisis de perfilado de expresión de genes enfocados en el estudio de T-ALL, predice que la vía de Notch podría tener más de 2 000 genes blancos candidatos a ser regulados por Notch-1, c-myc y Hes-1, así como una posible red de regulación en conjunto, Notch-1 y c-myc, promoviendo genes blanco comunes (Iso et al., 2003).

2.5 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que están intrínsecamente relacionadas. De manera normal, las células crecen y se dividen para mantener la homeostasis de órganos y sistemas del cuerpo. Cuando los procesos reguladores de la proliferación celular normal y de la homeostasis presentan defectos y las células continúan en proliferación, se generan células transformadas que forman una masa celular denominada tumor (Hanahan & Weinberg, 2011). Los tumores malignos o cancerosos presentan células capaces de invadir y destruir el tejido a su alrededor. Asimismo, algunas células cancerosas poseen la capacidad de metástasis, es decir de desprenderse del tumor, entrar al sistema circulatorio o al sistema linfático y propagar el foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició, proceso denominado metástasis y es posible que cuando se trata el cáncer, vuelva a reincidir en algunas ocasiones.

Aunque la heterogeneidad del cáncer es vasta entre tumores como dentro del tumor, Hanahan y Weinberg (2011) lograron unificar la enfermedad al establecer un marco organizado y racional que permite comprender la diversidad neoplásica, a esto lo denominaron los marcadores del cáncer. Así, las características o *hallmarks* que definen el cáncer son: a) una señalización continua de proliferación, b) auto-suficiencia de las señales de crecimiento, c) insensibilidad o resistencia a inhibidores de crecimiento, d) evasión de la apoptosis, e)

angiogénesis y f) la capacidad de invasión y metástasis. Cabe destacar que debido a la variabilidad de las vías y alteraciones que llevan a la transformación celular, la adquisición de estas características puede ocurrir en diferentes momentos durante la progresión del cáncer y en secuencias diferentes entre los tumores del mismo tipo, así como entre tumores de diferente origen. Posteriormente, se aumentaron dos nuevas características emergentes a los datos revisados en la última década, g) la evasión del sistema inmune y h) la desregulación del metabolismo energético, así como mencionan dos factores que hacen permisible el desarrollo de cáncer, la inflamación promotora del tumor y la inestabilidad genómica junto con las mutaciones.

Los tres principales factores de riesgo que pueden aumentar la posibilidad de padecer cáncer son el consumo de tabaco, el sobre-peso y las infecciones persistentes de ciertos patógenos (virus, bacterias o parásitos). A pesar de su tardía clasificación como factor de riesgo de cáncer por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), las infecciones crónicas por patógenos tienen efectos destacados. Se ha estimado que el 20% de los cánceres diagnosticados a nivel mundial están relacionados con la infección de patógenos (Bouvard et al., 2009). La infección crónica de *Helicobacter pylori* es un factor importante en el desarrollo de cáncer gástrico, el virus de la hepatitis B es un factor de riesgo para desarrollar cáncer de hígado, el Virus de Papiloma Humano (VPH) también ha sido clasificado como un factor de riesgo, principalmente de CaCU (IARC, 2007).

2.5.1 Cáncer Cervico-Uterino (CaCU)

En México el CaCU es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia. El INEGI reportó que las mujeres entre 45-49 años representaban el 15.1% de los casos, las mujeres entre 40-44 años el 14% de los casos, finalmente las mujeres entre 50-54 años representaron el 13.2%

de pacientes con cáncer cervical en el 2008. Anualmente se registran 12,500 nuevos casos, mientras que se reportan 5,200 muertes (Instituto Nacional de Cancerología, 2010).

Aunque a nivel mundial la incidencia de CaCU ha disminuido, en países en vías de desarrollo, como México, existen poblaciones en zonas de menor desarrollo, que tienen mayor tasa de mortalidad por falta de diagnóstico oportuno y tratamiento tardío (Sánchez-Barriga, 2012), mientras que el 80% de los nuevos casos en Estados Unidos pudieron prevenirse con el uso de la vacuna anti-VPH (Siegel et al., 2014).

2.5.2 El virus de papiloma humano (VPH)

El principal factor de riesgo para desarrollar CaCU es la infección persistente por el virus VPH. Entre los tipos de VPH de mayor importancia clínica se encuentran los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 y 51, denominados de alto riesgo debido a que se relacionan con la progresión de diferentes tipos de cáncer (zur Hausen, 2002), teniendo predilección por los tejidos ano-genitales y orofaríngeos. El 90% de los cánceres de ano, el 60% de los cánceres de orofaringe en sitios secundarios, el 40% de los cánceres de vagina, vulva y pene se relacionan con el VPH y el 99.8% de los cánceres de cérvix o cuello uterino se deben a la infección persistente por VPH (Jemal et al., 2013). Del 99.8% de los cánceres cervico-uterinos asociados al VPH, el VPH tipo 16 está relacionado con el 55%, mientras que el VPH tipo 18 está relacionado con el 15% (Chelimo et al., 2013). Se ha propuesto que los VPHs de alto riesgo tienen preferencia por los queratinocitos indiferenciados que se encuentran en la capa basal y que son mitóticamente activas, el acceso a esta capa ocurre a través de microlesiones. Cuando la infección es productiva, los virus persisten en un estado episomal y su expresión génica está dirigida principalmente a la amplificación del genoma viral y, por tanto, a la proliferación de las células infectadas, debido a que la replicación del DNA viral depende de la maquinaria de replicación de la célula hospedera (Figura 9).

2.5.3 La línea celular de cáncer Cervico-Uterino HeLa

Las líneas celulares derivadas de tumores humanos son modelos fundamentales para estudiar la biología del cáncer, la evaluación de agentes anticancerígenos y para el desarrollo de fármacos anticancerígenos más selectivos (Ferreira et al., 2013). El desarrollo de líneas celulares de CaCU es pionera en el establecimiento *in vitro*, teniendo la línea celular HeLa la distinción de ser la primera línea celular inmortal en la historia en ser cultivada, la cual fue nombrada así por tomar las dos letras iniciales tanto del nombre como del apellido de la paciente del cual fue tomado: Henrietta Lacks, diagnosticada de adenocarcinoma cervical (Skloot, 2010). El adenocarcinoma que presentó la paciente no era ordinario debido a que era un cáncer glandular muy agresivo; la razón del éxito en el establecimiento de esta línea es que en CaCU ocurre la integración del genoma viral del VPH al genoma de la célula hospedera, se pierde parte del DNA viral eliminando la habilidad de producir viriones infecciosos, mientras que se retiene la funcionalidad de E6 y E7 (Egawa et al., 2015).

Como células derivadas de tumores, las células HeLa son distintas a las células humanas normales; un claro ejemplo es la alteración en los cromosomas, el cariotipo de una célula normal tiene 46 cromosomas, mientras que el cariotipo de células HeLa presenta de 76 a 80 cromosomas (Figura 8). Adey y colaboradores (2013) sugieren que el perfil hipertriploide surgió durante la tumorigénesis o en el establecimiento temprano de la línea celular. Asimismo, realizaron un análisis de un solo nucleótido (SNVs, *Single Nucleotide Variants*) observando que HeLa no había acumulado un gran número de SNVs somáticas relacionadas a variantes heredadas, lo que permite confirmar a HeLa como un modelo celular confiable y relativamente estable.

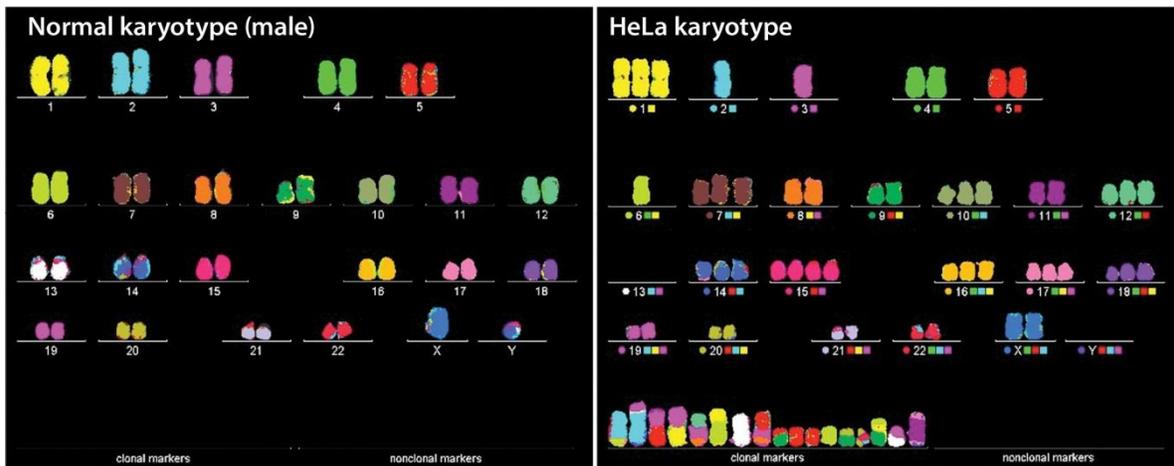


Figura 8. Comparación del cariotipo de célula normal con respecto al cariotipo de células HeLa. (Tomado de del Carpio, 2016).

En general se propone que dentro de la capa basal se encuentra una pequeña población de células troncales epiteliales (Moody & Laimins, 2010) y se ha sugerido que los VPHs requieren específicamente de las mismas y no de cualquier célula basal (Egawa 2003; López et al. 2012; Ortiz-Sánchez et al. 2016) (Figura 9). La idea de que los VPH residen específicamente en una célula troncal es compatible con la latencia del virus en una EpiSC quiescente, la reactivación del ciclo viral coincide cuando la EpiSC inicia su división, por último, la amplificación del genoma viral es explicada por las TACs que se originan en la división asimétrica de la EpiSC. Por lo tanto, es probable que el VPH tenga como blanco células con propiedades de troncalidad, o que los VPHs de alto riesgo puedan ser capaces de conferir propiedades de troncalidad a la célula que infecta (Egawa et al., 2015), en este caso HeLa tiene integrado el VPH de alto riesgo tipo 18.

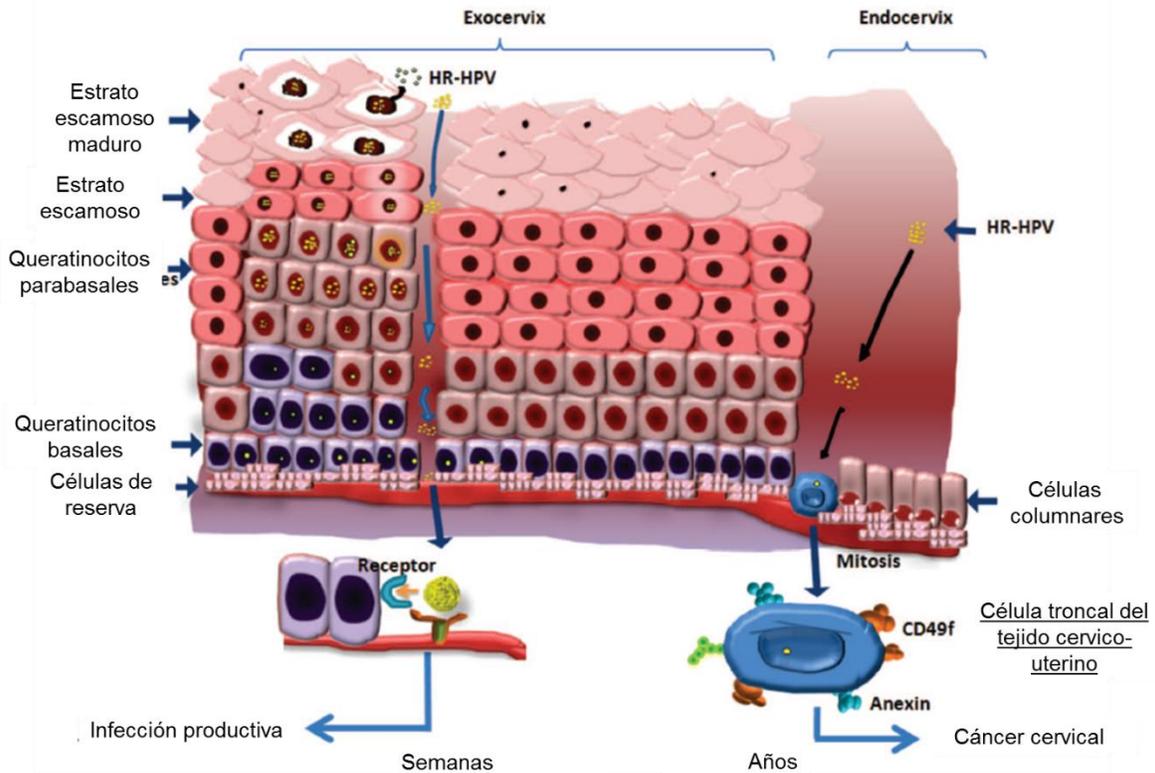


Figura 9. Dos resultados posibles a la infección por un VPH de alto riesgo. Un área donde es probable que se encuentran las células troncales del cuello uterino comprende la unión escamo-columnar, donde se encuentran ecto y el endo cérvix y se encuentran frecuentemente las células de reserva. Se propone que los VPH de alto riesgo infectan en el cuello uterino tanto células basales como troncales, en la que las primeras conducen a una infección productiva en la que lleva primero a una infección productiva en semanas y probablemente, generando cáncer más adelante. Tomado de López et al. (2012).

2.6 Notch y cáncer

La primera relación entre la vía de Notch con el desarrollo del cáncer fue en la T-ALL, en el 60% de este tipo de leucemias se identificó una translocación cromosómica t(7;9)(q34;q34.3)(Ellisen et al., 1991). La translocación ocurre en un punto frágil del cromosoma 9 dentro del locus de NOTCH1 y la región promotora del receptor- β de linfocitos T (TCR- β , por sus siglas en inglés *T-cell receptor- β*), que se expresa continuamente en los linfocitos B. Esta mutación provee dos ventajas a NOTCH1 mutado, una sobreexpresión por parte de TCR- β (Allenspach et al., 2002), así como una vida media mayor de la proteína, debido a que en la translocación se pierde la secuencia, generando una proteína que no tiene el dominio TAD (Liu et al., 2013). La ganancia de función de Notch-1 y su participación en el desarrollo de

cáncer, sugiere que es un oncogen en células hematopoyéticas; sin embargo, cuando Zweidler y colaboradores (2005) sobre-expresaron NICD 1-4, en líneas celulares de diferentes leucemias de linfocitos B, inhibieron el crecimiento e indujeron apoptosis de las células. Este resultado presenta un papel opuesto, supresor de tumores, al observado en linfocitos T, lo que implica una nueva función de Notch en cáncer, dependiendo del contexto celular.

En el tejido cerebral la vía de Notch es importante en el mantenimiento proliferación y diferenciación de las SC neurales, así como en el desarrollo de diversos tipos de neoplasias comoependimoblastoma, oligodendroglioma y meningioma (Chen et al. 2010). En meduloblastoma, el factor HIF1- α ayuda a la supervivencia de cultivos primarios induciendo la expresión de Notch-1, Hes-1 y Dll-4 (Pistollato et al., 2010). Una inhibición de la vía de Notch-1 en líneas celulares de glioblastoma redujo la proliferación y la viabilidad celular, induciendo autofagia, efecto mediado por su blanco Hes-5 (Yao et al., 2015). Chen y colaboradores (2010) obtuvieron CSC neurales mediante cultivos de formación de esferas que mantenían la señalización de Notch activa. Al inhibir la expresión de MAML en los cultivos de esferas detectaron una disminución de c-myc, Hes-1 y Hey-1 con respecto al control, así como una reducción en la capacidad de formación de esferas.

La participación de Notch en CSC de mama también ha sido estudiada ampliamente, tanto en células troncales mamarias, como en cáncer (Farnie & Clarke, 2007), ya sea en cultivos primarios de tumores o en cultivos de esferas con características de troncalidad (Grudzien et al., 2010). Reedijk y colaboradores (2005) encontraron un pequeño subgrupo en muestras de tumores de cáncer de mama que sobre-expresaban mRNA de receptores y ligandos de la vía de Notch, asociando una alta expresión de Notch-1 a una menor supervivencia del paciente, en comparación con pacientes con tumores con baja expresión de Notch. Patrawala y colaboradores (2005) aislaron la SP en la línea celular de cáncer de mama

MCF-7, que tenían mayor capacidad tumorigénica y mayor expresión de genes de troncalidad como Notch-1 y β -catenina, en comparación a la población no SP.

En otros tipos de tumores existen pocos estudios que refuerzan la participación de Notch en el mantenimiento de las CSC, como lo es en carcinoma esofágico (Song et al., 2013), cáncer gástrico (Du et al., 2014), cáncer de páncreas (Wang et al. 2011) o CaCU.

La activación de Notch, se ha visto involucrada en la participación de diferentes procesos biológicos del desarrollo del CaCU, como la progresión del tumor y la resistencia a fármacos (Ranganathan et al., 2011). En T-ALL el receptor de Notch presenta mutaciones que ayudan a una expresión aberrante de la vía; sin embargo, en CaCU la sobreexpresión de la vía se ha dado en células con el receptor de Notch intacto (Weijzen et al., 2003), despertando interés debido a que normalmente es difícil de detectar en núcleo (Maliekal et al., 2008).

La presencia de NICD se ha correlacionado con la progresión de cáncer (Sun et al., 2015). Daniel y colaboradores (1997) reportaron una mayor expresión de Notch-1 en tumores de cáncer CaCU con respecto a una neoplasia cervical intraepitelial tipo III (CIN III). Zagouras y colaboradores (1995) encontraron en tejidos metaplásicos, tejidos de carcinomas escamosos cervicales y de adenocarcinomas, una mayor expresión de Notch en comparación con el tejido normal adyacente. Ramdass y colaboradores (2007) encontraron que los queratinocitos diferenciados de epitelio cervical normal expresaban bajos niveles de Notch en citoplasma, mientras que en muestras de tejidos de pacientes que presentaban hiper-proliferación u otra anomalía celular, la expresión de Notch se encontró en pequeños grupos de células de la capa basal y con una localización nuclear.

Se ha reportado que Notch es regulado positivamente por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16; sin embargo, únicamente cuando se co-expresa E6 y E7 con la oncoproteína H-Ras, la expresión de Notch-1 se encuentra en núcleo y en determinadas células, induciendo

una activación funcional de la vía, mientras que cuando inocularon células de la línea celular Caski con Notch-1 silenciado en ratones inmunodeficientes; éstas células fueron incapaces de desarrollar tumores en comparación a las células con Notch-1 activo (Weijzen et al., 2003). En la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT, la activación de Notch sinergiza con los oncogenes E6 y E7 de VPH de alto riesgo en la transformación celular y resistencia a la apoptosis (Rangarajan et al., 2001).

Existen datos que sostienen que, dependiendo de los niveles de expresión, Notch puede contrarrestar la actividad del VPH. En la línea celular de CaCU Caski, la sobreexpresión de NICD reduce la señalización de TGF- β /Smad, mediante el secuestro de p300 (Masuda et al., 2005). En líneas celulares de CaCU se ha reportado que niveles moderados de Notch ayudan a la viabilidad y proliferación celular. Henken y colaboradores (2012) asociaron una expresión de Notch dependiente de dosis en la transformación inducida por VPH: una dosis moderada de Notch aumentó la viabilidad celular, mientras que una alta expresión de Notch redujo la capacidad clonogénica de células de la línea celular SiHa. Lathion y colaboradores (2003) emplearon dos promotores para la expresión de Notch-1 en HeLa, el promotor de citomegalovirus (CMV, promotor fuerte) y el promotor de la repetición terminal larga del virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV por sus siglas en inglés de *Moloney murine leukemia virus*, un promotor débil). Al expresar positivamente Notch-1, con el promotor de CMV, se redujo la actividad del promotor VPH16 afectando la viabilidad celular, mientras que cuando se expresó Notch de manera moderada, no se obtuvo un efecto significativo.

Un trabajo más enfocado en células con capacidades de tipo troncal fue el de Gu y colaboradores (2011); al obtener cultivos de esferas con CSCs en la línea celular HeLa observaron una disminución en los niveles de mRNA de las tres isoformas de TGF- β . A diferencia de esto, Wang y colaboradores (2007) al sobre expresar Notch-1 en células HeLa observaron una reducción en la capacidad de formación de esferas. También observaron una

reducción en el crecimiento y proliferación *in vitro*, lo cual fue asociado con la inducción de apoptosis. Estos datos con resultados opuestos proponen a Notch como un oncogen, así como un supresor de tumor.

Dentro del grupo de investigación de Ortiz y colaboradores (2016) se caracterizaron líneas celulares de CaCU (HeLa y SiHa) que presentaron subpoblaciones celulares con alta actividad de la enzima ALDH con la finalidad de seleccionar células con características de troncalidad así como tumorigénicas, mediante LDA. Debido a esto, se propone la siguiente hipótesis:

3. Hipótesis

Si la vía de Notch participa en el mantenimiento de las células troncales cancerosas de CaCU, entonces la inhibición de la vía reducirá la subpoblación de las células con fenotipo y potencial clonogénico en los cultivos enriquecidos en células tipo troncales cancerosas derivadas de la línea celular HeLa.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición de la vía de Notch sobre el mantenimiento de la subpoblación de células troncales cancerosas derivadas de cultivos derivados de la línea celular de cáncer cervico-uterino HeLa.

4.1 Objetivos específicos

1. Obtener cultivos enriquecidos en CSCs de la línea celular HeLa, de cáncer cervico-uterino (CaCU) identificados mediante la evaluación de la actividad de la enzima ALDH y análisis funcional de los cultivos de esferas.
2. Evaluar el estado de activación de la vía de Notch en cultivos enriquecidos en CSCs de HeLa en comparación con su contraparte en adherencia.

3. Evaluar la relevancia de la activación de Notch en el mantenimiento de la población enriquecida en CSCs de la línea celular HeLa, a través de la inhibición de la vía.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo celular

La línea celular de cáncer Cervico-Uterino HeLa VPH-18 y la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3 se cultivaron a 37° C bajo 5% de CO₂ y humedad del 70% en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibiótico 1% (100 U/ml de bencilpenicilina y 100 µg/ml de estreptomicina).

5.2 Inhibición de la vía de Notch

Los cultivos en monocapa se incubaron con el vehículo (DMSO) o con el compuesto MK-0752 (Santacruz technologies), un inhibidor de la enzima γ -secretasa la cual se encarga de cortar el receptor Notch, generando el fragmento activo NICD lo que permite la activación posterior de la vía, a diferentes concentraciones. Para seleccionar la concentración a emplear se evaluó la viabilidad y citotoxicidad celular por MTT así como se realizaron inmunofluorescencias de diferentes cultivos co-incubados con el inhibidor a diferentes concentraciones, para evaluar el efecto de la inhibición.

5.3 Viabilidad celular y citotoxicidad

Para el ensayo MTT se sembraron 5,000 células por cada pozo en una placa de 96 pozos y se trataron con varias concentraciones del inhibidor MK-0752 o con DMSO al 0.1% (Vehículo) por 72 horas. La citotoxicidad se determinó por el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol); el producto de la reacción (formazan) se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO, vehículo) y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos del ensayo de MTT se emplearon para obtener

los porcentajes de viabilidad utilizando la Ecuación 1, con lo cual se determinó la IC₅₀ (50% de inhibición de crecimiento) empleando el software GraphPad Prism.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

Ecuación 1 Determinación de la viabilidad celular

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

Donde:

DO células control: Densidad óptica (absorbancia a 570 nm) de células tratadas con el vehículo

DO células tratadas: Densidad óptica (absorbancia a 570 nm) de células tratadas con una concentración del inhibidor MK-0752.

Después de ser incubadas por 72 hrs con el inhibidor, las células viables se contaron por exclusión de azul tripano y se procedieron a sembrar en medio de formación de esferas en la densidad descrita posteriormente.

5.4 Ensayo de formación de esferas

Para el cultivo de formación de esferas, se cosecharon cultivos de HeLa a un máximo de 80% de confluencia con Tripsina/EDTA (Tripsina 0.05%, EDTA 0.5mM, Dextrosa 5mM, NaCl 137 mM, KCl 5.3 mM, NaHCO₃ 0.58 mM) y se lavaron con PBS (pH 7.2, NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄) para eliminar por completo el medio. Las soluciones celulares se disgregaron perfectamente para evitar agrupados celulares y después se procedió a contar las células viables en la cámara de Neubauer por el método de exclusión de azul tripano. Se sembraron 8 ml de cultivo de esferas con una densidad celular de 8000 células/ml en medio Mammocult™ con el suplemento recomendado por el fabricante al 10% (Stem cell technologies Inc.), 0.48 µg/ml de hidrocortisona, 4 µg/ml de heparina y antibiótico 1% (100 U/ml bencilpenicilina y 100 estreptomycin) en cajas de ultra baja adherencia. Se cultivaron a

37°C, 5% de CO₂ y humedad del 70%. Una cantidad adicional de 4 ml de medio de cultivo de esferas se agregó al cultivo al día 4. Las esferas se cosecharon a los días 1, 3, 5 y 7, se disgregaron con verseno (0.02% EDTA en solución salina de fosfatos, PBS), se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se lavaron con PBS para análisis posteriores.

5.5 Citometría de flujo

5.5.1 Viabilidad celular

Para la detección de muerte celular se emplearon al menos 50 000 células HeLa de los diferentes tratamientos los cuales no se fijaron. Se tiñeron con una dilución de zombie violet 1:200 en PBS siguiendo las instrucciones del fabricante (Biolegend). Las células se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm y se resuspendieron en flow buffer para su lectura por citometría de flujo en el canal de Pacific Blue™. Todas las citometrías de flujo se realizaron empleando el citómetro de flujo FACSAria II (BD Immunocytometry Systems Franklin Lakes, NJ).

5.5.2 Ensayo ALDEFLUOR®

La detección de la actividad de la enzima ALDH se determinó por el kit de ALDEFLUOR® (Stem cell technologies) para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Al menos 50,000 células se resuspendieron en 500 µl de buffer de ensayo ALDEFLUOR® conteniendo 2.5 µl del sustrato activo ALDEFLUOR® (BODIPY-aminoacetaldehído, solución stock 0.3mM) un sustrato de la enzima ALDH. De cada muestra la mitad (250 µl) se colocó en otro vial donde se le adicionó 2.5 µl de la solución stock 1.5 mM de dietil-amino-benzaldehído (DEAB) un inhibidor específico de la enzima ALDH, ambos viales se incubaron a 37°C por 40 minutos. Después de la incubación las células se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en 500 µl del buffer de ensayo ALDEFLUOR® manteniéndose en hielo hasta su lectura. La actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa

se midió considerando la cantidad de producto fluorescente producido por reacción. Las células que presentaron una alta actividad de la enzima ALDH (ALDH^{Alto}) se detectaron empleando el detector FL-1 en el citómetro de flujo tomando como referencia los niveles de fluorescencia de la muestra control con DEAB.

5.6 Inmunoblot

Las células en cultivo de adherencia (Monocapa) al 80% de confluencia fueron tripsinizadas y recuperadas, mientras que las células en cultivo de esferas fueron recuperadas por centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos. Se extrajo la proteína total con buffer de lisis (0.1M PMSF, inhibidor de proteasas 1x, Tris HCl 0.05M, EDTA 0.005M, NaCl 0.150M, Tritón X-100 1%). La concentración de proteína por muestra se determinó usando el Kit BCA (Thermo Fisher Scientific). Para la electroforesis se emplearon 45 µg de la muestra y se corrieron en geles al 10% de acrilamida. Después se electro-transfirieron en membranas de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA, USA). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente por una hora con TBS-Tween (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M y Tween-20 al 0.05 % (v/v)) más 5% de leche baja en grasa. Se emplearon los anticuerpos primarios anti-Notch-1 activo (NICD-1) (#3608, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), anti-c-myc (sc-40, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) y anti-GAPDH (sc-48167, Santa Cruz Biotechnologies), los cuales se diluyeron 1:1000 para NICD-1 y c-myc y 1: 10,000 para GAPDH en TBS-Tween con 5% de leche baja en grasa. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación constante. Después se lavaron 3 veces con TBS-Tween y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario. Las membranas se incubaron por 2 hrs. a temperatura ambiente empleando los anticuerpos secundarios anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra acoplados a peroxidasa (HRP) todos a una dilución 1: 10,000 (Respectivamente para NICD-1, c-myc y GAPDH). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween al 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo. Finalmente, las membranas se incubaron con los sustratos quimio-

luminiscentes (Millipore) para permitir la detección de las proteínas de interés a través del equipo Li-cor (LI-COR Biosciences). La cuantificación se realizó por análisis densitométrico de las imágenes obtenidas empleando el software ImageJ®.

5.7 Ensayos de clonogenicidad

La formación de colonias se realizó para monitorear el crecimiento independiente de anclaje. Diez mil células fueron cosechadas de cada tratamiento y embebidas en medio DMEM adicionado con 10% de SFB y agar noble al 0.8%. Los cultivos se dejaron crecer por 15 días, se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 0.005%. Se contaron manualmente las colonias formadas en 5 campos diferentes por cajas de 6 pozos observadas al 10x en un microscopio invertido simple (Olympus CKX31).

En los tratamientos se sembraron 500 células en cajas de 6 pozos en condiciones de adherencia con DMEM y suplementado con 10% de SFB, 10 días después se fijaron con una solución de Metanol: Ácido acético 1:1 y se tiñeron con cristal violeta al 0.005% por una hora. Se contaron todas las colonias visibles, con más de 50 células.

5.8 Inmunofluorescencias

Se sembraron células de HeLa, o NIH3T3 como línea celular positiva de expresión de NICD-1, bajo diferentes tratamientos, en cubreobjetos para su inmunotinción. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, permeabilizaron con tritón X-100 al 0.3% y bloquearon con SFB al 10% por 1 hora a temperatura ambiente. Los cultivos en monocapa o de esferas se tiñeron con el anticuerpo primario anti-NICD-1 (ab8925, Abcam) en una dilución de 1:75 o anti- α tubulina (SC-32293 Santa Cruz) en una dilución 1:50 toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se emplearon como anticuerpos secundarios un anti-IgG policlonal de conejo conjugado con FITC para NICD-1 en una dilución 1:100 y un anti-IgG policlonal de ratón conjugado con FITC para actina, (ambos de Vector Laboratories Inc.). Los núcleos se tiñeron con DAPI para cultivos

en monocapa y con Hoechst 33342 para esferas. Las imágenes de los cultivos se capturaron en un microscopio de epifluorescencia al 10x, y se analizaron con el programa ImageJ.

Para el análisis de cultivos de esferas, las células se recuperaron por centrifugación a 700 rpm por 5 minutos, se concentró una alta cantidad de esferas teñidas en PBS las cuales tuvieron un tratamiento similar al de cultivos en monocapa. Después de ser teñidas la solución de esferas de tres días se embebió en agar de bajo punto de fusión al 1% en una relación 1:1, las imágenes de las esferas fueron obtenidas con el microscopio Light Sheet con el objetivo 10x y se analizaron con el software zen.

5.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA), con significancia al 5%. Los valores de p fueron calculados por la prueba t de student. Los resultados se representan como la media \pm Desviación estándar (SD). Un valor de p menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo, los cuales se muestran como asteriscos.

6. RESULTADOS

6.1 Enriquecimiento de células con características de troncalidad en cultivos de la línea celular HeLa

Con la finalidad de obtener cultivos enriquecidos en células con características de CSC en CaCU con elevada actividad ALDH ($ALDH^{Alto}$) se realizaron ensayos de formación de esferas. Para esto se sembraron células HeLa en cultivos de esferas a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 días). Posterior a eso se evaluó la actividad de la enzima ALDH por citometría de flujo y se comparó con un cultivo en monocapa. Los cultivos que presentaron un mayor porcentaje de células $ALDH^{Alto}$ fueron los obtenidos al tercer día (Figura 10) en comparación con el cultivo en monocapa, lo cual fue estadísticamente significativo ($p \leq 0.001$). En los siguientes días, el porcentaje de células $ALDH^{Alto}$ se mantuvo constante con respecto a cultivos en monocapa.

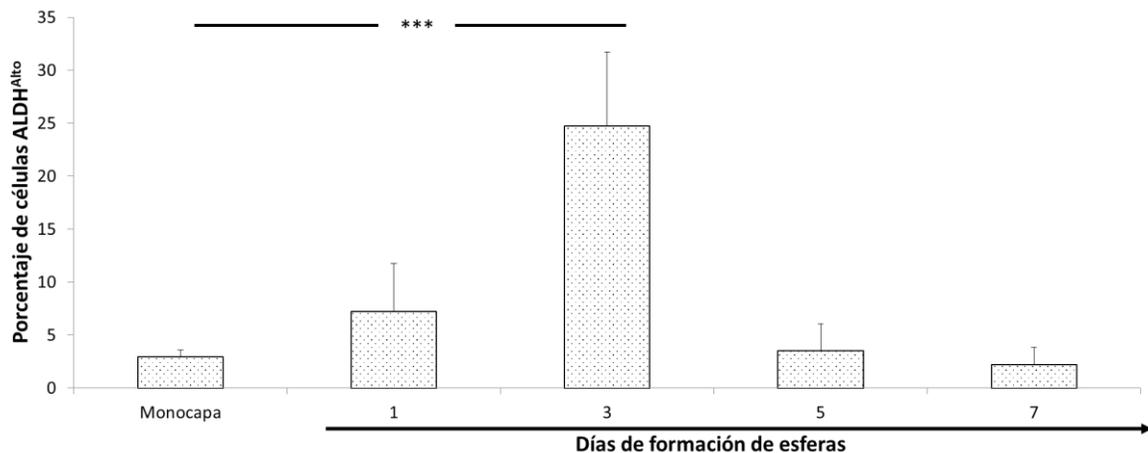


Figura 10 **Porcentaje de subpoblaciones $ALDH^{Alto}$ en cultivos de formación de esferas y cultivos en monocapa.** A través de una cinética tiempo-dependiente, la actividad de la enzima ALDH se midió mediante fluorescencia por citometría de flujo, de acuerdo al kit de detección ALDEFLUOR® y con el protocolo recomendado. *** $p \leq 0.001$. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

El potencial clonogénico se ha propuesto como una medida *in vitro* de la capacidad tumorigénica, una característica que define a las CSCs. Por tanto, se evaluó la capacidad de clonogenicidad independiente de anclaje en ensayos de agar suave a los diferentes días de cultivo. Al igual que lo obtenido al evaluar la actividad de la enzima, la mayor capacidad de formación de colonias tipo holoclonas (colonias compactas y definidas como lo reportan, Barrandon & Green, 1987) se obtuvo al tercer día en cultivo de formación de esferas (Figura 11).

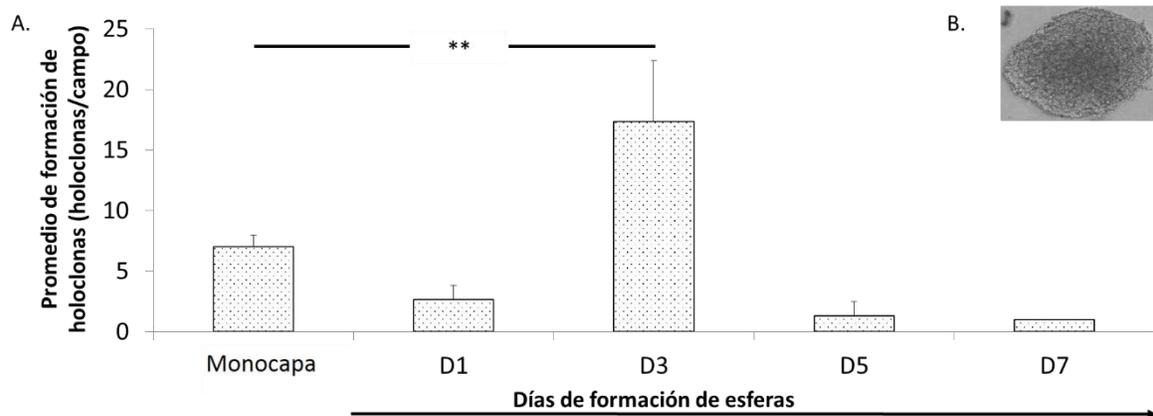


Figura 11 Eficiencia de formación de colonias a diferentes días de cultivo de formación de esferas y en monocapa. A) Eficiencia de formación de colonias (EFC) de cultivos esferas a diferentes días. B) La EFC se determinó únicamente considerando las holoclonas formadas con una morfología similar a la presentada. Se contaron las holoclonas en diferentes campos con aumento a 10x. ** $p \leq 0.01$. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

La actividad de la enzima ALDH, junto con el análisis funcional de las células, medidas a través de la capacidad de formación de colonias, nos permiten confirmar que es al tercer día de cultivo de esferas, donde se obtiene la mayor proporción de células con características de troncalidad.

6.2 Activación de la vía de Notch en cultivos enriquecidos en células con características de células troncales de CaCU y en cultivos en monocapa.

Para evaluar la activación de la vía de Notch, se extrajo proteína de los cultivos de esferas mantenidos a diferentes días y se evaluó la presencia del receptor Notch-1 activo llamado NICD-1, así como c-myc, un blanco de la vía de Notch (Figura 12A). El análisis densitométrico (Figura 12B) no mostró diferencias significativas en la presencia relativa de NICD-1 a los diferentes días de formación de esferas con respecto a la monocapa.

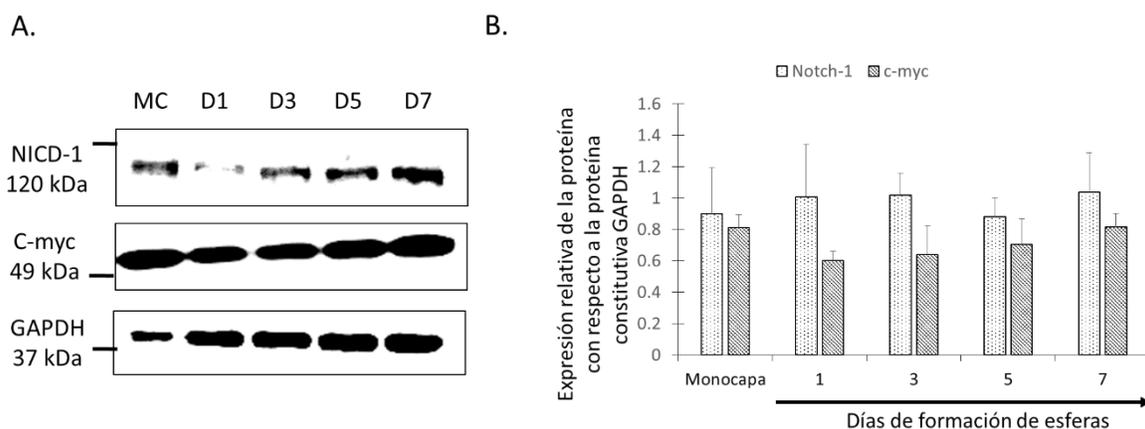


Figura 12 Activación de la vía de Notch. A) Se evaluaron los niveles de expresión del ligando activo NICD-1 (Dominio Intracelular de Notch-1) y un blanco de la vía, c-myc; la enzima de GAPDH fue empleada como proteína constitutiva para inmunoblot. B) Densitometría de tres repeticiones independientes del inmunoblot de NICD-1 y c-myc: GAPDH fue empleado como proteína constitutiva. Los valores fueron normalizados con respecto a la proteína constitutiva. MC: Monocapa, D1-D7: Días de cultivo de formación de esferas. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

Por otro lado, la evaluación de Hes-1, un blanco directo de la vía de Notch, mostró un aumento en los días 1 y 3 (Figura 13).

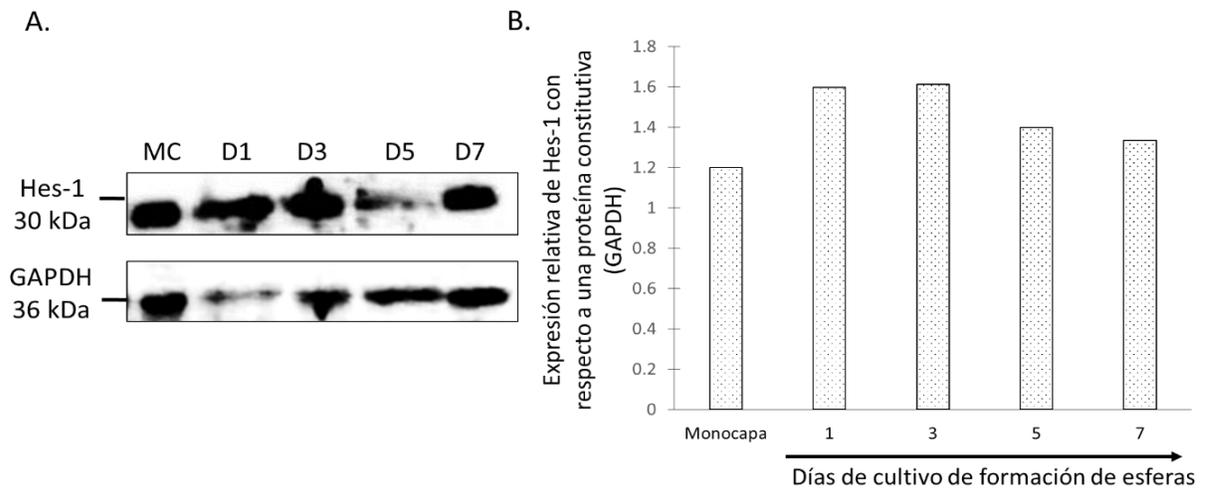


Figura 13 Cinética de Hes-1 en cultivos en condiciones de no adherencia. A) Se evaluó el nivel de expresión de un blanco directo de la vía, Hes-1; la enzima de GAPDH fue empleada como proteína constitutiva para inmunoblot. B) Densitometría del inmunoblot de Hes-1, empleando GAPDH como proteína constitutiva. Los valores fueron normalizados con respecto a la proteína constitutiva. MC: Monocapa, D1-D7: Días de cultivo de formación de esferas. Se muestra el análisis de una sola determinación.

Similar a otras proteínas, únicamente cuando Notch-1 activo (NICD-1) se transloca al núcleo se enciende la maquinaria que lleva a la expresión de los genes blanco. Con la finalidad de evaluar si el receptor activo NICD-1, se translocó al núcleo (el sitio adecuado para promover la expresión de los genes blanco de la vía de Notch) evaluamos su localización celular en nuestro modelo de estudio por inmunofluorescencia.

Como parte de los controles de la técnica, en la Figura 14A se muestra la inmunodetección de α tubulina la cual se observa claramente en el citoplasma. Como control positivo de Notch-1 activo se empleó la línea celular NIH3T3, como se indica en la hoja técnica del anticuerpo. En las inmunofluorescencias se puede observar la señal en el núcleo de todas las células (Figura 14B).

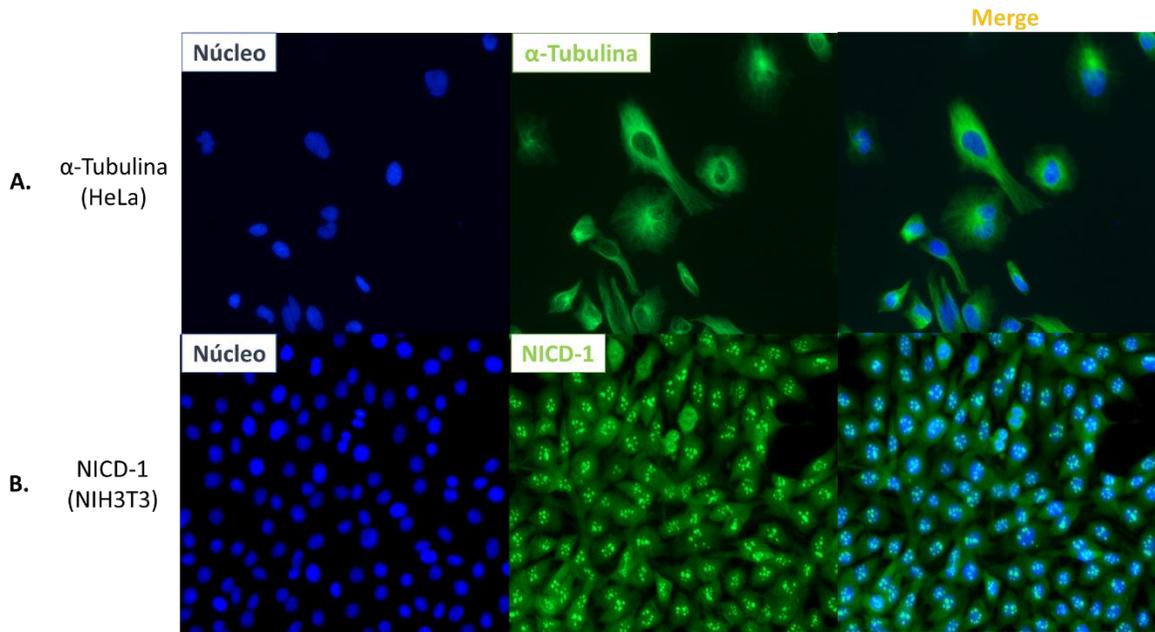


Figura 14 Controles de inmunofluorescencia. A) Inmunofluorescencia de tubulina en cultivos en adherencia de la línea celular HeLa, con presencia en citoplasma. B) Inmunofluorescencia de Notch-1 activo (NICD-1), en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3, un control positivo de expresión de NICD-1. Las imágenes fueron tomadas al 20x en un microscopio de epifluorescencia.

En los cultivos en adherencia se puede observar que NICD-1 se encuentra en casi todas las células, lo que correlaciona con el western-blot (Figura 13); sin embargo, solo ciertas células presentaron altos niveles de NICD-1 en el núcleo (Figura 15A), mientras que en la mayoría de las células que conforman las esferas de 3 días, se puede observar una localización preferentemente nuclear del receptor activo de Notch-1, NICD-1 (Figura 15B).

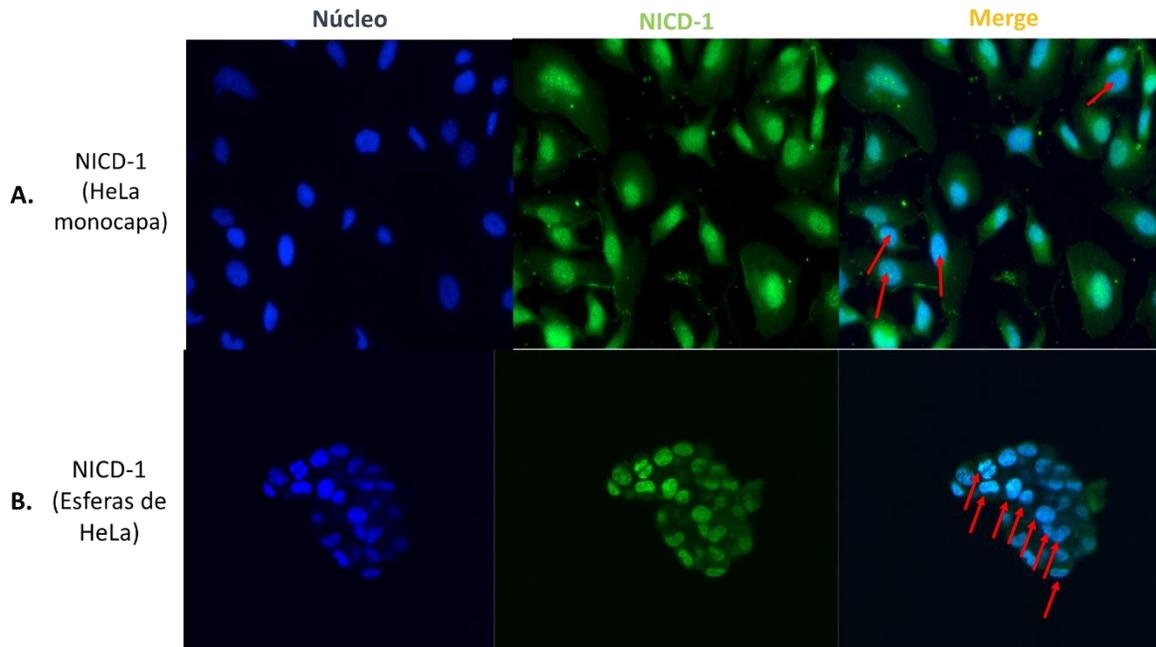


Figura 15 Localización de NICD-1 en cultivos en monocapa y esferas derivados de la línea celular HeLa. A) Inmunofluorescencia de NICD-1 en cultivos en monocapa de HeLa B) Inmunofluorescencia de NICD-1 en esferas de tres días. En el caso de NICD-1, únicamente cuando transloca al núcleo se activa la transcripción de genes río abajo, de acuerdo a la inmunofluorescencia, se puede observar la expresión en núcleo en ciertas células. Las flechas rojas indican células que expresan NICD-1 en núcleo. Las imágenes de A fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia al 40x, las imágenes de B, fueron obtenidas en microscopio lightsheet al 20x.

Se contaron las células con alta expresión de NICD-1 nuclear en ambas condiciones. Como se puede observar en la Figura 16, el mayor porcentaje de células con alta expresión de NICD-1 nuclear se encuentran en los cultivos enriquecidos en células con un mayor potencial clonogénico, así como ALDH^{Alto} y tumorigénico (Ortiz-Sánchez et al., 2016), mientras que en los cultivos en monocapa, el porcentaje de células con alta expresión de NICD-1 en núcleo fue menor.

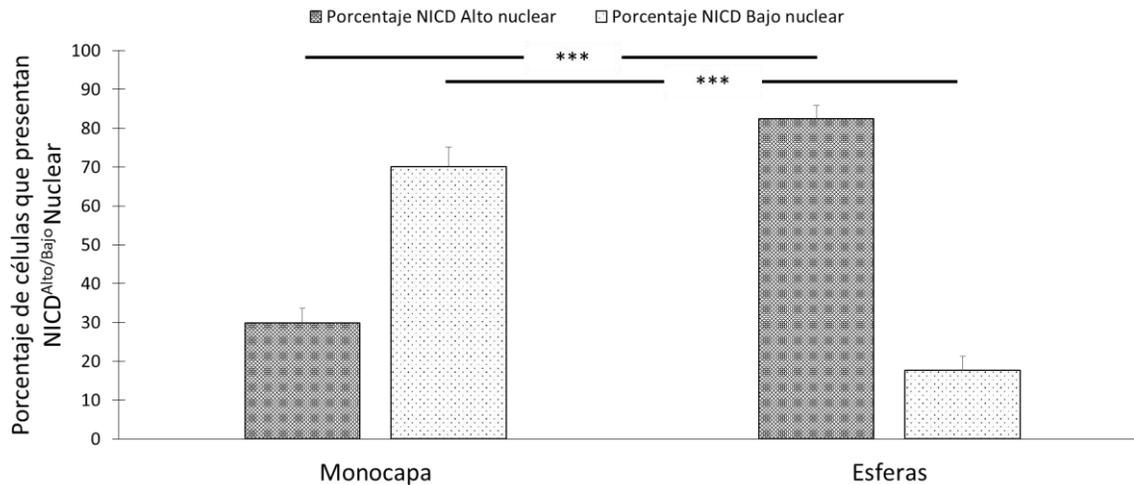


Figura 16 Incremento de NICD-1 nuclear en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas. Se consideraron el número de células con alta localización de NICD-1 nuclear como NICD-1^{Alto}, mientras que las células que tuvieron menor localización nuclear o citoplásmica, se consideraron como NICD-1^{Bajo}. El conteo de células se realizó en imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia al 40x. Se muestra el promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones.

La inmunolocalización de NICD-1 en nuestros modelos celulares, nos ha permitido establecer que, comparado con células HeLa en monocapa, existe una menor cantidad de células con NICD-1 en núcleo con respecto a las células que componen las esferas de 3 días, que sumado a la detección de Hes-1 (Figura 13), sugieren la participación de Notch, dentro las vías de señalización involucradas en la biología de las CSC de CaCu.

6.3 Efecto de la inhibición de la vía de Notch sobre la población con características de células troncales cancerosas de HeLa.

Para evaluar el papel del receptor Notch-1 en cultivos enriquecidos en células con características de CSCs de CaCu, se empleó MK-0752, un inhibidor de la enzima γ -secretasa, el cual bloquea el corte de Notch-1, inhibiendo su actividad en cultivos en monocapa. Se realizó una curva de dosis-respuesta para evaluar la concentración inhibitoria 25, 50 o 75 (IC50 e IC75) de MK-0752 a través de la medición de la viabilidad de las células incubadas por 72 hrs a través de un ensayo de MTT. Empleando la regresión no lineal la ecuación de Hill, se seleccionaron tres concentraciones para evaluar la inhibición de la vía de Notch por

inmunofluorescencia (Figura 17A). Como se puede observar en la Figura 17C con una concentración de 164 μM (IC₂₅) no se observó inhibición, con una concentración de 210.44 μM (IC₅₀, Figura 17D) se observa una marcada disminución de la marca nuclear de NICD-1, mientras que a 269.5 μM (IC₇₅, Figura 17E) no se observa la presencia de este fragmento en el núcleo.

Debido a que desde una concentración de 210.44 μM se puede observar una reducción en la presencia de NICD-1 en el núcleo y evitar una alta citotoxicidad, se procedió a evaluar únicamente esta concentración para los experimentos posteriores.

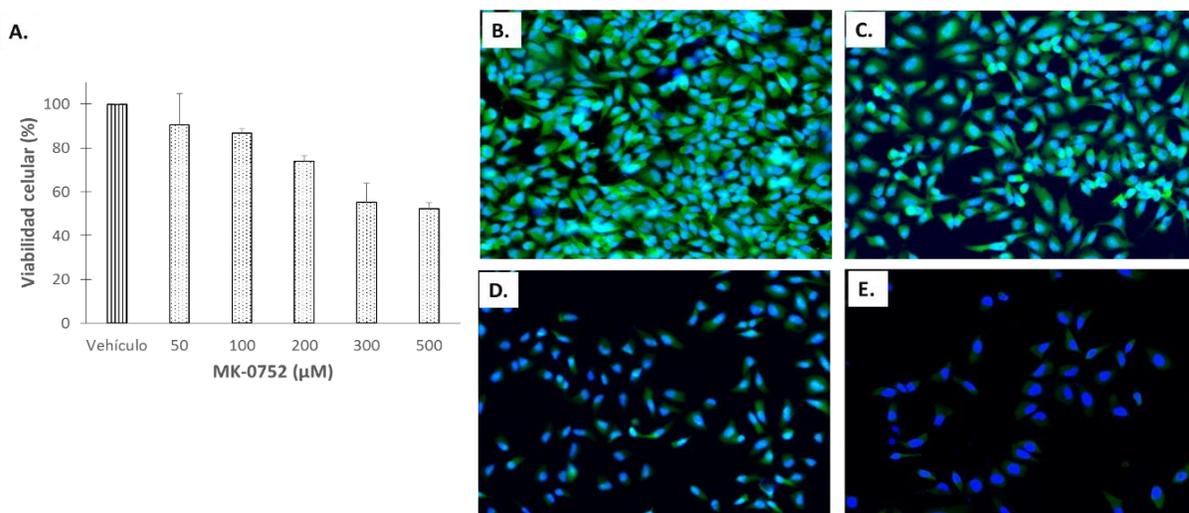


Figura 17 Efecto de la inhibición de la vía de notch en cultivos en monocapa. A) Se evaluó la viabilidad de cultivos en monocapa de células HeLa a diferentes concentraciones de MK-0752, un inhibidor de la enzima γ -secretasa, en un intervalo de concentración de 50 - 500 μM después de 72 hrs; el inhibidor MK-0752 impide el corte de NICD en la parte citoplásmica. B) La inhibición de la vía se evaluó mediante la fluorescencia de NICD-1 con el vehículo C) 164 μM , D) 210.44 μM y E) 269.5 μM del inhibidor. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia al 10x. En A se muestra el promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones.

Con la concentración de 210.44 μM , se evaluó el efecto de la inhibición en cultivos enriquecidos de células con características de troncalidad. Se trataron cultivos en monocapa por 72 hrs con el inhibidor, sin inhibidor, y con el vehículo. Posteriormente se contaron células viables por el método de exclusión de azul tripano y se sembraron en cultivos para la formación de esferas. El efecto de la inhibición de la vía de Notch en los cultivos de HeLa en monocapa

con la que se inician los cultivos enriquecidos en CSC se evaluó al tercer día de formación de esferas basadas en los resultados descritos en las Figura 10 y Figura 11.

Se evaluó la actividad de la enzima ALDH en las esferas, donde se observó una marcada disminución de células ALDH^{Alto} respecto a su control, indicando la importancia de la vía de Notch para el enriquecimiento de células con características de CSC en los primeros tres días de formación de esferas (Figura 18).

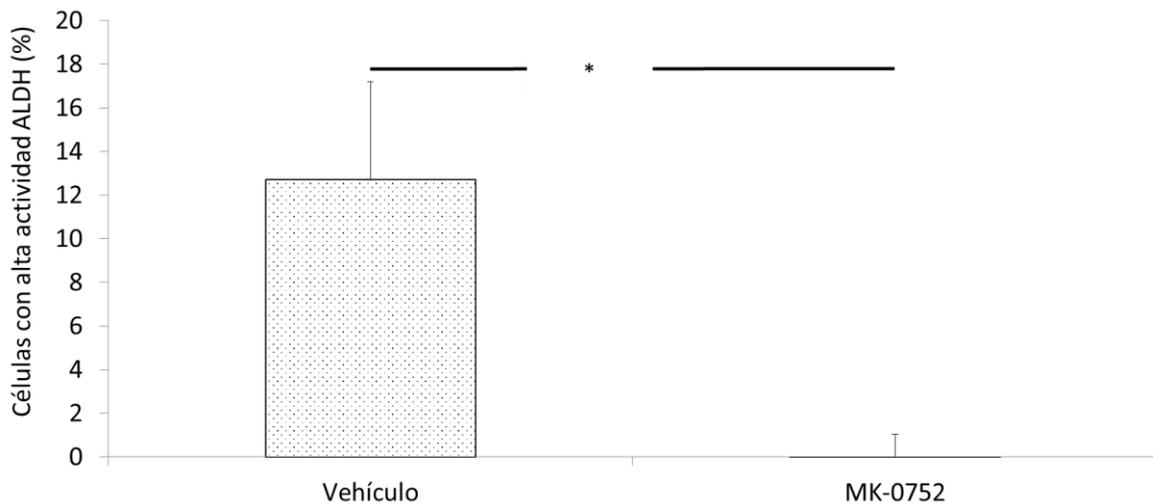


Figura 18 La inhibición de la vía de Notch eliminó la subpoblación celular con alta actividad de la enzima ALDH. La actividad fue medida al tercer día de cultivo en medio de formación de esferas mediante fluorescencia por citometría de flujo. Se contaron al menos 10 000 células empleando el kit de detección ALDEFUOR® con el protocolo recomendado. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres repeticiones. * $p \leq 0.05$.

Por otro lado, aunque sí se observó una disminución en el porcentaje de células ALDH^{Alto}, la viabilidad celular de los cultivos en esferas pre-incubadas con el inhibidor MK-0752 no se vio afectada (Figura 19).

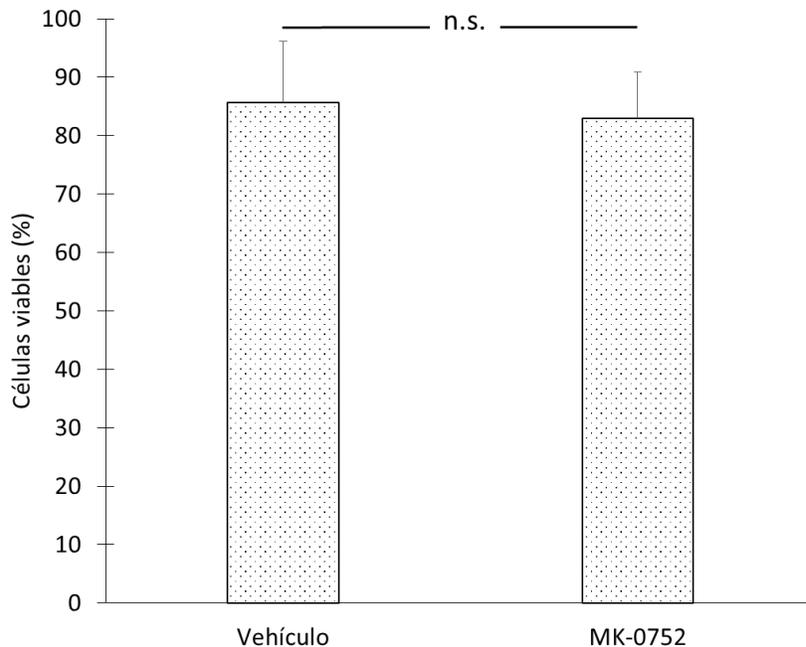


Figura 19 La inhibición de la vía de Notch no afectó la viabilidad en las células mantenidas en cultivos de formación de esferas. Se empleó el inhibidor de la enzima γ -secretasa MK-0752 a una concentración de 210.44 μ M. Las mediciones se realizaron al contar al menos 10,000 células por citometría de flujo. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres repeticiones. n.s. No significativo.

Además de la resistencia a la citotoxicidad del inhibidor MK-0752, característica de las CSC, se evaluó la capacidad funcional de las células, a través de la formación de colonias. Los resultados mostrados en la Figura 20 B muestran una disminución estadísticamente significativa de colonias con el tratamiento con MK-0752, lo que demuestra la relevancia de la activación de la vía de Notch en la capacidad clonogénica de los cultivos enriquecidos en CSC de CaCU; sin embargo, es evidente que estos cultivos enriquecidos mantienen, en menor grado, la capacidad de formar colonias.

Con la finalidad de evaluar la localización de la proteína activa de la vía de Notch en estos ensayos, se realizó la inmunodetección de NICD-1 en las esferas tratadas con el inhibidor MK-0752. En la Figura 20 C se observa que aun cuando hay células que contienen la proteína NICD-1 solo en citoplasma en las esferas tratadas con el inhibidor, co-existen células positivas para la presencia la proteína NICD1 en el núcleo celular; observaciones que

fueron comparadas con su respectivo control de esferas sin inhibidor (Figura 20 C superior). Esta podría ser una de las razones por la cual se generaron colonias a partir de cultivos de esferas tratadas con MK-0752, lo que sugiere que la vía de Notch es inhibida parcialmente (Figura 20 A).

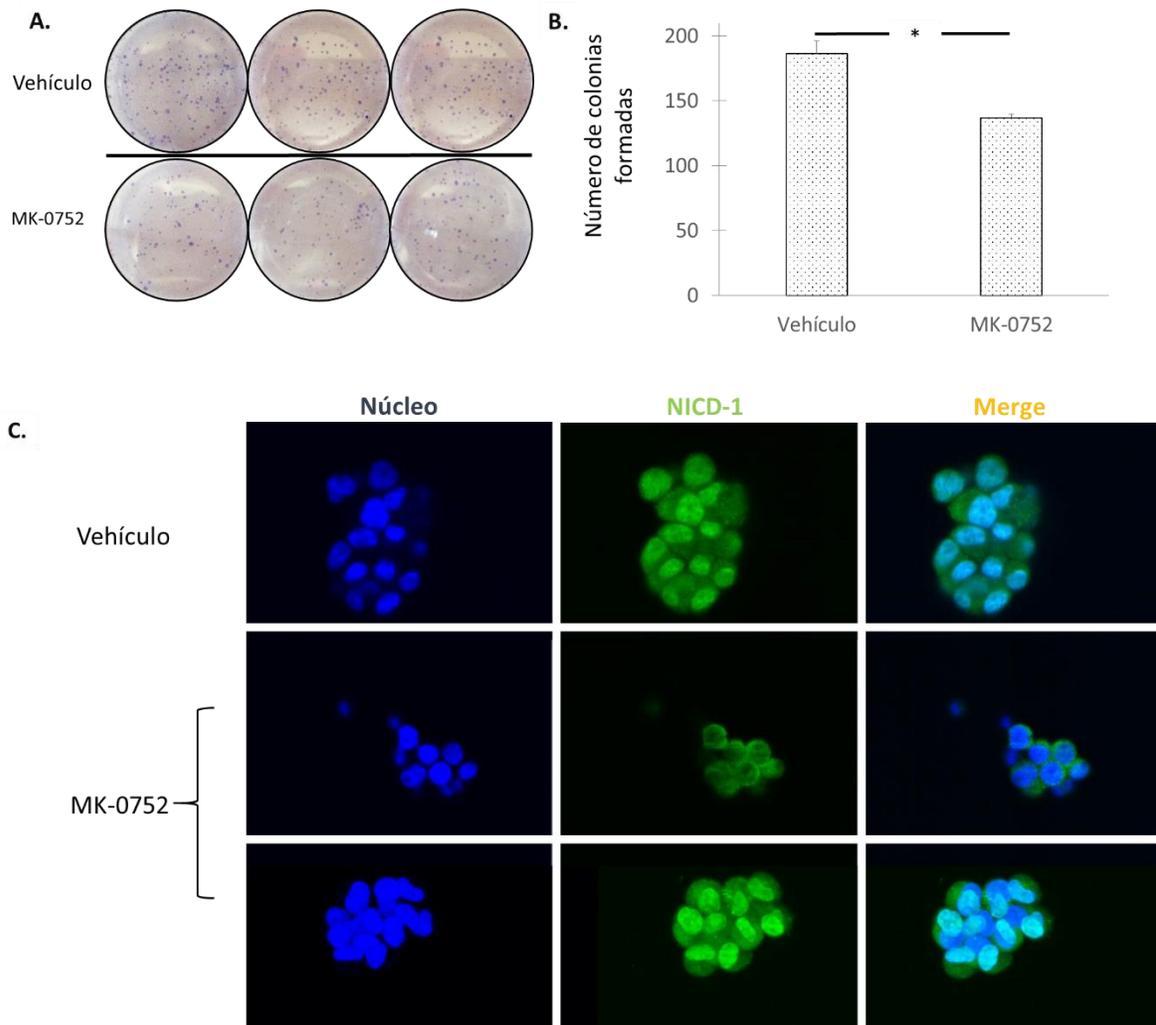


Figura 20 Disminución de la capacidad clonogénica por efecto de la inhibición de la vía de Notch. A) Células tratadas con el vehículo (DMSO) o tratadas con el inhibidor de la enzima γ -secretasa MK-0752 (210.44 μ M). Se muestran imágenes representativas de formación de colonias. B) Conteo de colonias formadas. C) Inmunofluorescencia de esferas tratados con el vehículo o tratadas con el inhibidor, las imágenes de la parte media muestra una esfera representativa que tiene completamente inhibida la vía de Notch, por NICD-1, mientras que las imágenes inferiores muestran una esfera que presenta una inhibición parcial de la vía de Notch. Todas las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal light-sheet al 20x. En B se muestra el promedio y desviación estándar de tres repeticiones.

Cuando se contaron el número de células con alta expresión de NICD-1 nuclear entre los cultivos de formación de esferas de tres días pre-incubados con el vehículo en comparación con los cultivos pre-incubados con el inhibidor MK-0752, se observó una reducción significativa en el número de células con alta localización de NICD-1 nuclear (Figura 21).

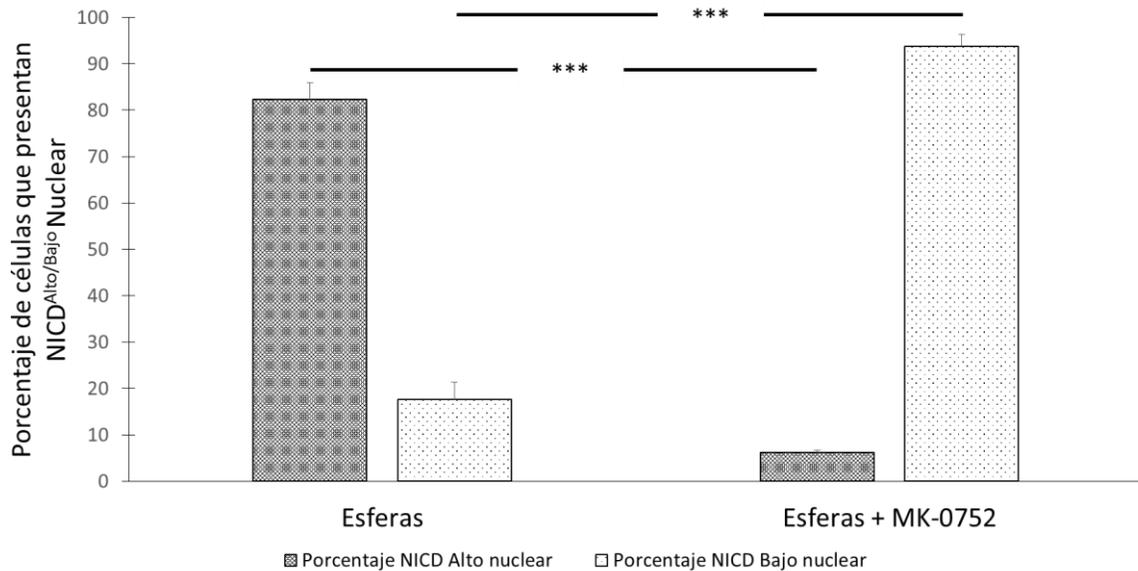


Figura 21 Disminución de células con NICD^{Alto} en células inhibidas con la vía de Notch. Se consideraron el número de células con alta localización de NICD-1 nuclear como NICD-1^{Alto}, mientras que las células que tuvieron menor localización nuclear o citoplásmica, se consideraron como NICD-1^{Bajo}. El conteo de células se realizó en imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia al 40x. Se muestra el promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones.

7. Discusión

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la relevancia de la vía de Notch, en la generación de cultivos enriquecidos en CSC de CaCU. Los resultados obtenidos con el desarrollo de este trabajo demuestran, en primer lugar, que al tercer día de cultivo de formación de esferas hay un incremento significativo del porcentaje de células ALDH^{Alto} comparado con lo obtenido en cultivos de monocapa y a los otros tiempos estudiados. Este resultado nos permite observar que es en los tres primeros días en donde se llevan a cabo los mecanismos de mantenimiento de las posibles CSC presentes en nuestros cultivos de formación de esferas, esto además de que después del tercer día el porcentaje de células ALDH^{Alto} disminuye.

La evaluación de la actividad de la enzima ALDH, ha permitido separar y aislar subpoblaciones enriquecidas en CSC (ALDH^{Alto}) de diferentes tipos de tumores. Burger y colaboradores (2009) separaron de próstata de ratones C57BL/6 poblaciones tanto ALDH^{Alto} como ALDH^{bajo} y dentro de la población celular con ALDH^{Alto} enriquecieron subpoblaciones de células del epitelio basal, así como células menos diferenciadas que expresaban el marcador Sca-1, un marcador de troncalidad en modelos murinos (Holmes & Stanford, 2007). Específicamente en CaCU, se han identificado células con capacidad de auto-renovación y tumorigenicidad en líneas celulares (Liu & Zheng, 2013), mediante la separación de células ALDH^{bajo} y ALDH^{Alto}; en donde, únicamente las células con alta actividad enzimática, ALDH^{Alto} expresaron algunos factores de transcripción asociados a la troncalidad como OCT-4 y Nanog así como fueron capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes. Además de estudios en otras CSC de diferentes tumores, recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que la población celular ALDH^{Alto} de las esferas de HeLa y SiHa poseen una mayor capacidad tumorigénica comparada con células con ALDH^{Bajo} y aún más con células en adherencia, en este trabajo observan un aumento en Nanog en cultivos de esferas derivadas de las líneas celulares de CaCU, así como identificaron la presencia de β -catenina (Ortiz-

Sánchez et al., 2016), un factor de transcripción blanco de la vía de Wnt que participa en el mantenimiento de SC y CSCs (Prasetyanti et al., 2013).

Al igual a lo obtenido en los ensayos de ALDH, en este trabajo encontramos que las células de cultivos de esferas de 3 días tienen un mayor potencial clonogénico comparado con las esferas de los días 5 y 7, en donde de manera interesante se observó una disminución en la capacidad clonogénica en comparación a cultivos en monocapa. En concordancia con estas observaciones, Conley y colaboradores (2012) determinaron un incremento de la población celular ALDH^{Alto} al cuarto día de cultivo de diferentes líneas celulares de cáncer de mama en hipoxia, una condición que permite el enriquecimiento de CSCs, observando una disminución al sexto día de cultivo. Con esto, la mayor capacidad clonogénica *in vitro* obtenida en el presente trabajo, se puede asociar al enriquecimiento con células ALDH^{Alto} en el mismo día. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que al inocular 10 000 células HeLa provenientes de cultivos de esferas o 10 000 células HeLa ALDH^{Alto} obtuvieron el mismo potencial tumorigénico *in vivo*; sin embargo, solamente las células ALDH^{Alto} tienen la capacidad de generar tumores tras la inoculación de 1000 células ALDH^{Alto} en ratones nu/nu (Ortiz-Sánchez et al., 2016).

Así, la suma de la evaluación de la actividad de la enzima ALDH con la evaluación de potencial clonogénico de los cultivos de esferas corrobora el enriquecimiento de células con fenotipo y características de CSCs en cultivos de formación de esferas. Por otro lado, esta observación obtenida al tercer día de cultivo en esferas sugiere que es dentro de los primeros días cuando se llevan a cabo los procesos de mantenimiento de las posibles CSC de CaCU, comparado con los siguientes días en donde se observa una clara disminución desde el día 5, debido quizá, al aumento de la proliferación de células progenitoras derivadas de las células con características de CSCs enriquecidas en los primeros tres días.

La selección de Notch-1 para evaluar el estado de activación de la vía de Notch en CaCu se debe a que este ligando se ha visto involucrado en este tipo de cáncer. Sun y colaboradores (2015) asociaron un aumento de receptores Notch en la progresión de lesiones intra-epiteliales a cáncer cervical. Ramdass y colaboradores (2007) reportaron que en carcinoma celular escamoso, existe un cambio en la localización de los receptores Notch de citoplasma a núcleo. Lee y colaboradores (2014), encontraron una sobreexpresión de Notch-1 y Notch-2 en adenocarcinoma cervical de desviación mínima (una variante poco común de CaCU) con respecto a tejido endocervical proliferativo normal; sin embargo, la localización de Notch-2 fue preferentemente citoplásmica. Mientras que los otros receptores no tienen ninguna correlación, Talora y colaboradores (2005) no identificaron Notch-3 y Notch-4 en líneas celulares de CaCU.

En el presente trabajo no se observaron diferencias en los niveles de NICD-1 total a los diferentes días de cultivo en esferas en comparación con el cultivo en monocapa por western-blot. A través de cultivos de formación de esferas de HeLa tratados con una nanopartícula esférica de quinacrina, Nayak y colaboradores (2016) observaron un incremento de apoptosis en las CSCs de HeLa así como una disminución de las proteínas β -catenina, un activador transcripcional de la vía de Wnt, y Gli1, implicado en la vía de Hedgehog; sin embargo, al igual que los resultados obtenidos en este trabajo, no detectaron diferencias en los niveles de NICD-1, por western blot; sin embargo, en el presente estudio se observó un incremento en la presencia de Hes-1 un blanco de directo de la vía. Es por esto que, a pesar de que la presencia de la proteína es importante, evaluados en el presente trabajo por western blot, la localización es un factor prioritario para conocer el estado de activación de la vía.

Con estos antecedentes, se procedió a la evaluación de la localización de la proteína NICD-1 por inmunofluorescencia, donde pudimos observar que en cultivos en monocapa de HeLa, ciertas células son negativas para NICD-1 o se encuentran en citoplasma y sólo un bajo

porcentaje de células presentan NICD-1 en núcleo, es decir que sugiere la activación de la vía de señalización. En células no cancerosas, utilizadas como control positivo como NIH3T3, una baja detección de NICD-1 en núcleo se debe a que diversas ubiquitin ligasas presentes en dicho organelo tienen como blanco la secuencia PEST en el dominio C-terminal de NICD-1, lo que hace que tenga una vida media corta (Wu et al., 2001). Li y colaboradores (2015) detectaron NICD-1 en núcleos de células troncales/progenitoras neuronales; sin embargo, cuando son infectadas con citomegalovirus (CMV) observaron complejos del retículo endoplásmico o el aparato de Golgi asociados con NICD-1 marcado con ubiquitina en citoplasma lo cual asociaron a una regulación génica viral para la degradación de NICD-1 dependiente del proteasoma. Es por esto que se podría sugerir que la localización de NICD-1 podría estar influenciada por la presencia de las proteínas virales.

A diferencia del cultivo en monocapa, en cultivos de tres días de formación de esferas, la localización de NICD-1 en núcleo se observó en todas las células. La localización de Notch activo (NICD-1) preferencialmente en núcleo de las células que conforman a las esferas derivadas de la línea celular HeLa con características de CSCs no se había observado previamente. De manera indirecta, la presencia de NICD-1 se había asociado con la progresión de cáncer *in situ* a carcinoma invasivo. Bajaj y colaboradores (Bajaj et al., 2011) detectaron una subpoblación de células en biopsias de carcinoma cervical escamoso y en la línea celular de CaCU CaSki, que expresaban CD66⁺ así como la regulación positiva de la vía de señalización Notch mediada por NICD-1. Esta población era más tumorigénica y capaz de migrar, intravasarse y de hacer metástasis en nódulos linfáticos en comparación a las células que no presentaban NICD-1.

Es probable que exista una regulación que permita la viabilidad de células que presentan la vía de Notch activa tanto en cultivos en monocapa como en cultivos de esferas, ya que en trabajos como el de Henken y colaboradores (2012) mostraron que solamente una

moderada expresión de Notch ayuda a la viabilidad de células de la línea celular Si Ha, mientras que una alta activación de la vía de Notch la reduce. Se ha propuesto que además de la regulación de la activación de la vía de Notch, también podrían existir otras proteínas que seleccionen los genes a ser activados. Vliet-Gregg y colaboradores (2013) reportaron que la proteína NFX1-123 tiene un efecto sinérgico con la proteína E6 en la activación de la vía de Notch mediada por el ligando Notch-1. El mismo grupo de trabajo también reportó que NFX-123 se sobre expresa en HeLa (VPH -18) y en queratinocitos de prepucio humano transfectados con E6 del VPH-16 y NFX1-123 modula los blancos de la vía de Notch diferencialmente, sobre expresando positivamente genes asociados a diferenciación, como la citoqueratina 10 (K10), mientras que blancos asociados al arresto del ciclo celular, como p21, no se sobre expresaron (Vliet-Gregg et al., 2015); por lo que sería interesante evaluar el nivel de esta proteína en nuestros cultivos de esferas.

En epitelio normal y en células reprogramadas para inducción del estado de troncalidad de las SCs epiteliales (células troncales pluripotentes inducidas, iPS), la expresión de Notch se ha visto involucrada principalmente en regular el destino final y la diferenciación de la SC para mantener la homeostasis del tejido (Suprynowicz et al., 2012). Basados en los resultados obtenidos con nuestro modelo de estudio, consideramos que la participación de la vía de Notch en CaCU se puede asociar al mantenimiento y adaptación de las CSCs, en un estado activo y nuclearmente localizado.

Los inhibidores de γ -secretasa (GSI, por sus siglas en inglés de *gamma-secretase inhibitor*) bloquean esta enzima en una conformación cerrada, haciéndola incapaz de escindir más sustratos (Andersson & Lendahl, 2014), por lo tanto la enzima γ -secretasa no podrá escindir Notch y no se podrá liberar NICD de la membrana citoplasmática para que transloque al núcleo y active la vía. La concentración de 210.44 μ M (IC50) del inhibidor, utilizada en nuestros ensayos muestra la inhibición de la localización nuclear de NICD-1 (principal efecto

a evaluar) en monocapa y su efecto en la generación de cultivos enriquecidos en CSC de CaCU, mientras que a mayores concentraciones del inhibidor en monocapa se observa un incremento de los efectos citotóxicos. Wang y colaboradores (2006) inhibieron la vía de Notch en líneas celulares provenientes de cáncer de páncreas y uno de los principales efectos que observaron fue la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular. En un estudio con líneas celulares derivadas de T-ALL los GSIs coadyuvan con fármacos utilizados en la quimioterapia, promoviendo un aumento de la apoptosis (Andersson & Lendahl, 2014).

Una alta sobreexpresión de Notch-1 puede influir negativamente en el potencial clonogénico; Henken y colaboradores (2012) demostraron que una sobre-expresión moderada de Notch, en la línea celular SiHa, induce un mayor potencial clonogénico, en comparación a células cuya sobre-expresión de Notch fue mayor, por lo que esta respuesta puede depender del contexto celular. Mazzone y colaboradores (2010) identificaron una respuesta fenotípica heterogénea en cultivos de líneas celulares de mama no tumorigénicas a los cuales transfectaron NICD-1. Las células que sobre-expresaron más NICD-1 formaron estructuras incapaces de expresar proteínas de adhesión a la matriz extracelular, mientras que células que fueron capaces de generar colonias más grandes e hiper-proliferativas presentaron menores dosis de NICD-1. Estos antecedentes sugieren que una concentración *moderada* de NICD-1 permitiría evaluar otras respuestas asociadas a funciones del mantenimiento de las CSCs.

Específicamente, en este trabajo demostramos que al inhibir la vía de Notch se observa una marcada reducción del número de células ALDH^{Alto}, un efecto independiente de la inducción de apoptosis debido a que no se observó un cambio en la viabilidad celular entre los tratamientos, y de células con potencial clonogénico, lo que confirma el papel de Notch en el mantenimiento de cultivos enriquecidos en células con características de CSC de CaCU. Se sabe que enzimas como la ALDH, pueden ser reguladas por diferentes mecanismos. Zhao y

colaboradores (2014) demostraron la regulación pos-traducciona l de la enzima ALDH1A1 a través de la desacetilasa SIRT2, la cual es un blanco de la vía Notch. Específicamente, cuando SIRT2 retira el grupo acetilo de la lisina 353 de la enzima ALDH1A1 permite recuperar la actividad enzimática en un 50%; asimismo, también observaron que subpoblaciones ALDH^{Alto} obtenidas tanto de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 como de cultivos primarios de tumores de pacientes tienen una menor cantidad de enzima acetilada. En contraste, al inhibir la vía de Notch observaron un aumento en la acetilación de la lisina 353 de ALDH en 48 hrs, en comparación con su control, demostrando así uno de los mecanismos inhibitorios en el mantenimiento de poblaciones enriquecidas en CSCs, lo que correlaciona con los resultados reportados en este trabajo. Además de esta regulación inmediata, la inhibición de la vía de Notch reduce la proteína ALDH1A1 a largo plazo; Zhao y colaboradores (2016) inhibieron la vía de Notch por 14 días en ratones desnudos BALB/c con tumores generados a partir de un xenotransplante de la línea celular de CAL27, de carcinoma escamoso de cabeza y cuello y observaron una disminución en el volumen del tumor, así como una reducción en la proteína ALDH1. En nuestros ensayos, las células HeLa de monocapa se incubaron con el inhibidor Mk-0752 por 72 horas, lo que podría sugerir que el efecto en la disminución de la población ALDH^{Alto} sea en parte por la acetilación de la enzima ALDH, un efecto que se evaluó tres días después; sin embargo, cuando observamos el efecto posterior a la inhibición de la vía de Notch (14 días después) mediante el potencial clonogénico, los resultados no son tan marcados.

8. Conclusión

La vía de Notch se activa en cultivos derivados de la línea celular HeLa enriquecidos en células con un alto potencial clonogénico, tipo células troncales cancerosas, representadas por la alta actividad de la enzima ALDH (ALDH^{Alto}). Así mismo, al inhibir la vía de Notch, la subpoblación ALDH^{Alto} así como el potencial clonogénico disminuyen, lo que sugiere que la vía de Notch se suma las vías reguladoras del mantenimiento y adaptación de poblaciones con características de CSCs permitiendo su enriquecimiento en cultivos de esferas.

9. Referencias bibliográficas

- Adey, A., Burton, J. N., Kitzman, J. O., Hiatt, J. B., Lewis, A. P., Martin, B. K., ... Shendure, J. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*, *500*(7461), 207–11. <http://doi.org/10.1038/nature12064>
- Alexandra del Carpio. (n.d.). The good, the bad, and the HeLa - The Berkeley Science Review. Retrieved May 19, 2016, from <http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/>
- Allenspach, E. J., Maillard, I., Aster, J. C., & Pear, W. S. (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *1*(5), 466–476. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496471>
- Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(5), 357–78. <http://doi.org/10.1038/nrd4252>
- Appia, A. (2010). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks Table of contents. *Who*, (October).
- Austin, J., & Kimble, J. (1987). glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell*, *51*(4), 589–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677168>
- Bajaj, J., Maliekal, T. T., Vivien, E., Pattabiraman, C., Srivastava, S., Krishnamurthy, H., ... Krishna, S. (2011). Notch signaling in CD66+ cells drives the progression of human cervical cancers. *Cancer Research*, *71*(14), 4888–4897. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0543>
- Baker, R., & Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, *122*(2), 617–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625813>
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756–60. <http://doi.org/10.1038/nature05236>
- Barrandon, Y., & Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication, *84*(April), 2302–2306.

- Bastock, R., & St Johnston, D. (2008). Drosophila oogenesis. *Current Biology: CB*, 18(23), R1082-7. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.011>
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., & Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 432(7015), 324–331. <http://doi.org/10.1038/nature03100>
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 207–217. <http://doi.org/10.1038/nrm2636>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <http://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(10), 1631–1646. <http://doi.org/10.1007/s00018-009-8668-7>
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., ... Cogliano, V. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *The Lancet. Oncology*, 10(4), 321–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698>
- Bray, S., & Bernard, F. (2010). Notch targets and their regulation. *Current Topics in Developmental Biology*, 92(10), 253–75. [http://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92008-5](http://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92008-5)
- Bray, S., Chen, J. J., Kesari, S., Rooney, C., Strack, P. R., Chen, J. J., ... Driskell, R. R. (2009). Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 576–593. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0661>
- Burger, P. E., Gupta, R., Xiong, X., Ontiveros, C. S., Salm, S. N., Moscatelli, D., & Wilson, E. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(9), 2220–8. <http://doi.org/10.1002/stem.135>
- Byrd, D. T., & Kimble, J. (2009). Scratching the niche that controls *Caenorhabditis elegans* germline stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.09.005>
- Canter, R. J., Grossenbacher, S. K., Ames, E., & Murphy, W. J. (2016). Immune targeting of cancer stem cells in gastrointestinal oncology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(Suppl 1), S1–S10. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2015.066>
- Cave, J. W. (2011). Selective repression of Notch pathway target gene transcription. *Developmental Biology*, 360(1), 123–131. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.018>
- Ceder, J. a., Jansson, L., Ehrnström, R. a., Rönstrand, L., & Abrahamsson, P. A. (2008). The Characterization of Epithelial and Stromal Subsets of Candidate Stem/Progenitor Cells in the Human Adult Prostate. *European Urology*, 53(3), 524–532. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.11.028>
- Ceder, J. a., Jansson, L., Helczynski, L., & Abrahamsson, P. A. (2008). Delta-Like 1 (Dlk-1), a Novel Marker of Prostate Basal and Candidate Epithelial Stem Cells, Is Downregulated by Notch Signalling in Intermediate/Transit Amplifying Cells of the Human Prostate. *European Urology*, 54(6), 1344–1353. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.03.006>
- Chelimo, C., Wouldes, T. a, Cameron, L. D., & Elwood, J. M. (2013). Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *The Journal of Infection*, 66(3), 207–17. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.024>
- Chen, J. J., Kesari, S., Rooney, C., Strack, P. R., Chen, J. J., Shen, H., ... Griffin, J. D. (2010). Inhibition

- of Notch Signaling Blocks Growth of Glioblastoma Cell Lines and Tumor Neurospheres. *Genes & Cancer*, 1(8), 822–835. <http://doi.org/10.1177/1947601910383564>
- Chen, S., Lewallen, M., & Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*, 140(2), 255–265. <http://doi.org/10.1242/dev.083139>
- Chiba, S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells*, 24(11), 2437–2447. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0661>
- Chillakuri, C. R., Sheppard, D., Lea, S. M., & Handford, P. A. Notch receptor-ligand binding and activation: Insights from molecular studies, 23 Seminars in Cell and Developmental Biology 421–428 (2012). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2012.01.009>
- Clayton, E., Doupé, D. P., Klein, A. M., Winton, D. J., Simons, B. D., & Jones, P. H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature*, 446(7132), 185–9. <http://doi.org/10.1038/nature05574>
- Conley, S. J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A. N., ... Wicha, M. S. (2012). Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2784–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018866109>
- Curtis, H., & Schnek, A. (2008). *Curtis. Biología*. Retrieved from https://books.google.com.mx/books/about/Curtis_Biolog%C3%ADa.html?hl=es&id=mGadUVpdTLsC&pgis=1
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., & Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Current Topics in Developmental Biology*, 92(C), 73–129. [http://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92003-6](http://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92003-6)
- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*, 58, 267–284. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.58.062105.204854>
- Dang, T. P. (2012). Notch, apoptosis and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 727, 199–209. http://doi.org/10.1007/978-1-4614-0899-4_15
- Daniel, B., Rangarajan, A., Mukherjee, G., Vallikad, E., & Krishna, S. (1997). The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *Journal of General Virology*, 78(5), 1095–1101.
- Doorbar, J. (2007). Papillomavirus Life Cycle Organization and Biomarker Selection. *Disease Markers*, 23(4), 297–313. <http://doi.org/10.1155/2007/613150>
- Du, X., Cheng, Z., Wang, Y.-H., Guo, Z.-H., Zhang, S.-Q., Hu, J.-K., & Zhou, Z.-G. (2014). Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *World Journal of Gastroenterology*, 20(27), 9191–9. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.9191>
- Egawa, K. (2003). Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 207(3), 251–4. <http://doi.org/73085>
- Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863–90. <http://doi.org/10.3390/v7072802>
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., & Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), 649–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831692>

- Engel, A., & Schou, M. (2006). Assay of tumorigenicity in nude mice. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=02mLqzXwStUC&oi=fnd&pg=PA353&dq=Assay+of+Tumorigenicity+in+Nude+Mice&ots=75c_kxfHJL&sig=K1bA6cJXUc0ZwP_L3cUxcS_EP5g
- Espinoza, I., & Miele, L. (2013). Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 139(2), 95–110. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.02.003>
- Farnie, G., & Clarke, R. B. (2007). Mammary Stem Cells and Breast Cancer — Role of Notch Signalling, 169–175. <http://doi.org/10.1007/s12015-007-0023-5>
- Feng, D., Peng, C., Li, C., Zhou, Y., Li, M. I. N., Ling, B. I. N., ... Tian, Z. (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri, 1129–1134. <http://doi.org/10.3892/or>
- Gerhardt, D. M., Pajcini, K. V, Teresa, D., Tu, L., Jain, R., Xu, L., ... Pear, W. S. (2014). The Notch1 transcriptional activation domain is required for development and reveals a novel role for Notch1 signaling in fetal hematopoietic stem cells, 576–593. <http://doi.org/10.1101/gad.227496.113>
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., ... Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–67. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1797–806. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Grudzien, P., Lo, S., Albain, K. S., Robinson, P., Rajan, P., Strack, P. R., ... Foreman, K. E. (2010). Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation. *Anticancer Research*, 30(10), 3853–67. Retrieved from <http://ar.iiarjournals.org/content/30/10/3853.abstract>
- Gu, W., Yeo, E., McMillan, N., & Yu, C. (2011). Silencing oncogene expression in cervical cancer stem-like cells inhibits their cell growth and self-renewal ability. *Cancer Gene Therapy*, 18(12), 897–905. <http://doi.org/10.1038/cgt.2011.58>
- Guiu, J., Shimizu, R., D'Altri, T., Fraser, S. T., Hatakeyama, J., Bresnick, E. H., ... Bigas, A. (2013). Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(1), 71–84. <http://doi.org/10.1084/jem.20120993>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.yane.2012.02.046>
- Henken, F. E., De-Castro Arce, J., Rösl, F., Bosch, L., Meijer, C. J. L. M., Snijders, P. J. F., & Steenbergen, R. D. M. (2012). The functional role of Notch signaling in HPV-mediated transformation is dose-dependent and linked to AP-1 alterations. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 35(2), 77–84. <http://doi.org/10.1007/s13402-011-0062-4>
- Holmes, C., & Stanford, W. L. (2007). Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(6), 1339–47. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0644>
- Hsu, Y.-C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine*, 20(8), 847–56. <http://doi.org/10.1038/nm.3643>
- Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., ... Boman, B. M. (2009).

- Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Research*, 69(8), 3382–9. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4418>
- IARC. (2007). Human Papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.*, 90(Lyon, France). Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-6.pdf>
- Instituto Nacional de Cancerología. (2010). Cáncer en cifras. *Instituto Nacional de Cancerología*. Retrieved from <http://www.infocancer.org.mx/cncer-en-cifras-con487i0.html>
- Iso, T., Kedes, L., & Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 194(3), 237–255. <http://doi.org/10.1002/jcp.10208>
- Janes, S. M., & Watt, F. M. (2006). New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nature Reviews. Cancer*, 6(3), 175–83. <http://doi.org/10.1038/nrc1817>
- Jemal, A., Simard, E. P., Dorell, C., Noone, A.-M., Markowitz, L. E., Kohler, B., ... Edwards, B. K. (2013). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(3), 175–201. <http://doi.org/10.1093/jnci/djs491>
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., & Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 134(7), 1243–51. <http://doi.org/10.1242/dev.000786>
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., & Kobayashi, T. (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Development, Growth & Differentiation*, 50 Suppl 1, S97-103. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.00993.x>
- Kim, R. J., Park, J. R., Roh, K. J., Choi, A. R., Kim, S. R., Kim, P. H., ... Nam, J. S. (2013). High aldehyde dehydrogenase activity enhances stem cell features in breast cancer cells by activating hypoxia-inducible factor-2 α . *Cancer Letters*, 333(1), 18–31. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.026>
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216–33. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Kovall, R. A., & Blacklow, S. C. (2010). Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Current Topics in Developmental Biology*, 92, 31–71. [http://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92002-4](http://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92002-4)
- Krejčí, A., & Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes & Development*, 21(11), 1322–7. <http://doi.org/10.1101/gad.424607>
- Lajtha, L. G. (1979). Stem cell concepts. *Nouvelle Revue Française D'hématologie*, 21(1), 59–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/493107>
- Lathion, S., Schaper, J., Beard, P., & Raj, K. (2003). Notch1 Can Contribute to Viral-Induced Transformation of Primary Human Keratinocytes. *Cancer Res.*, 63(24), 8687–8694. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/24/8687.long>
- Lee, H., Kim, K. R., Cho, N. H., Hong, S. R., Jeong, H., Kwon, S. Y., ... Lee, Y. (2014). MicroRNA expression profiling and Notch1 and Notch2 expression in minimal deviation adenocarcinoma of uterine cervix. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), 334. <http://doi.org/10.1186/1477-7819-12-334>
- Levenbook, I. S., Petricciani, J. C., Qi, Y., Elisberg, B. L., Rogers, J. L., Jackson, L. B., ... Webster, B.

- A. (1985). Tumorigenicity testing of primate cell lines in nude mice, muscle organ culture and for colony formation in soft agarose. *Journal of Biological Standardization*, 13(2), 135–141. [http://doi.org/10.1016/S0092-1157\(85\)80019-6](http://doi.org/10.1016/S0092-1157(85)80019-6)
- Li, X., Upadhyay, a K., Bullock, a J., Dicolandrea, T., Xu, J., Binder, R. L., ... Smallwood, R. H. (2013). Skin Stem Cell Hypotheses and Long Term Clone Survival - Explored Using Agent-based Modelling. *Scientific Reports*, 3, 1904. <http://doi.org/10.1038/srep01904>
- Li, X.-J., Liu, X.-J., Yang, B., Fu, Y.-R., Zhao, F., Shen, Z.-Z., ... Luo, M.-H. (2015). Human Cytomegalovirus Infection Dysregulates the Localization and Stability of NICD1 and Jag1 in Neural Progenitor Cells. *Journal of Virology*, 89(13), 6792–804. <http://doi.org/10.1128/JVI.00351-15>
- Liu, N., Zhang, J., & Ji, C. (2013). The emerging roles of Notch signaling in leukemia and stem cells. *Biomarker Research*, 1(1), 23. <http://doi.org/10.1186/2050-7771-1-23>
- Liu, S., & Zheng, P. (2013). High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget*, 4(12), 2462–2475. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.1578>
- López, J., Ruíz, G., Organista-Nava, J., Gariglio, P., & García-Carrancá, A. (2012). Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *The Open Virology Journal*, 6, 232–40. <http://doi.org/10.2174/1874357901206010232>
- Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J., Watt, F. M., Roux, I. Le, ... Watt, F. M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by Delta Notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Current Biology: CB*, 10, 491–500. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982200004516>
- Lubman, O. Y., Ilagan, M. X. G., Kopan, R., & Barrick, D. (2007). Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *Journal of Molecular Biology*, 365(3), 577–89. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.071>
- Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., ... Yasutomo, K. (2003). Delta1-Notch3 Interactions Bias the Functional Differentiation of Activated CD4+ T Cells. *Immunity*, 19(4), 549–559. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00270-X](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00270-X)
- Maliekal, T. T., Bajaj, J., Giri, V., Subramanyam, D., & Krishna, S. (2008). The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors, 7, 5110–5114. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.224>
- Mao, X.-G., Zhang, X., Xue, X.-Y., Guo, G., Wang, P., Zhang, W., ... Yang, H. (2009). Brain Tumor Stem-Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15. *Translational Oncology*, 2(4), 247–57. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2781066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. K. (2011). Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. <http://doi.org/10.4161/cc.10.9.15486>
- Mascreé, G., Dekoninck, S., Drogat, B., Youssef, K. K., Brohéé, S., Sotiropoulou, P. A., ... Blanpain, C. (2012). janes 2006. *Nature*, 489(7415), 257–62. <http://doi.org/10.1038/nature11393>
- Masuda, S., Kumano, K., Shimizu, K., Imai, Y., Kurokawa, M., Ogawa, S., ... Chiba, S. (2005). Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300. *Cancer Science*, 96(5), 274–82. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00048.x>
- Mazzone, M., Selfors, L. M., Albeck, J., Overholtzer, M., Sale, S., Carroll, D. L., ... Brugge, J. S. (2010).

- Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5012–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000896107>
- Moody, C. a, & Laimins, L. a. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews. Cancer*, 10(8), 550–60. <http://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074. <http://doi.org/10.1038/nature04956>
- Nayak, A., Satapathy, S. R., Das, D., Siddharth, S., Tripathi, N., Bharatam, P. V., & Kundu, C. (2016). Nanoquinacrine induced apoptosis in cervical cancer stem cells through the inhibition of hedgehog-GLI1 cascade: Role of GLI-1. *Scientific Reports*, 6, 20600. <http://doi.org/10.1038/srep20600>
- Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., ... Lechler, R. I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 98(9), 2736–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675346>
- O'Brien, C. A., Kreso, A., & Jamieson, C. H. M. (2010). Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(12), 3113–3120. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2824>
- Ortiz-Sánchez, E., Santiago-López, L., Cruz-Domínguez, V. B., Toledo-Guzmán, M. E., Hernández-Cueto, D., Muñiz-Hernández, S., ... García-Carrancá, A. (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human Papilloma Virus co-receptor expression. *Oncotarget*. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.8218>
- Osborne, B. A., & Minter, L. M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(1), 64–75. <http://doi.org/10.1038/nri1998>
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., & Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(5), 486–98. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Zhou, J., Claypool, K., & Tang, D. G. (2005). Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Research*, 65(14), 6207–19. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0592>
- Pistollato, F., Rampazzo, E., Persano, L., Abbadi, S., Frasson, C., Denaro, L., ... Basso, G. (2010). Interaction of hypoxia-inducible factor-1 α and Notch signaling regulates medulloblastoma precursor proliferation and fate. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(11), 1918–29. <http://doi.org/10.1002/stem.518>
- Potten, C. S., Saffhill, R., & Maibach, H. I. (1987). Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell and Tissue Kinetics*, 20(5), 461–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3450396>
- Prasetyanti, P. R., Zimmerlin, C. D., Bots, M., Vermeulen, L., Melo, F. D. S. E., & Medema, J. P. (2013). Regulation of stem cell self-renewal and differentiation by Wnt and Notch are conserved throughout the adenoma-carcinoma sequence in the colon. *Molecular Cancer*, 12(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-12-126>
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepelmannesh, M., Pfeiffer, S., & Jensen, J.-M. (2009). Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 7(10), 899–910. <http://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x>
- Radtko, F., & Raj, K. (2003). THE ROLE OF NOTCH IN TUMORIGENESIS: ONCOGENE OR TUMOUR

SUPPRESSOR ?, 3(October), 756–767. <http://doi.org/10.1038/nrc1186>

- Ramdass, B., Maliekal, T. T., Lakshmi, S., Rehman, M., Rema, P., Nair, P., ... Radhakrishna Pillai, M. (2007). Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. *Gynecologic Oncology*, 104(2), 352–61. <http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.08.054>
- Rand, M. D., Grimm, L. M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S. C., Sklar, J., & Aster, J. C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1825–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ranganathan, P., Weaver, K. L., & Capobianco, A. J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 338–351. <http://doi.org/10.1038/nrc3035>
- Rangarajan, A., Syal, R., Selvarajah, S., Chakrabarti, O., Sarin, A., & Krishna, S. (2001). Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt. *Virology*, 286(1), 23–30. <http://doi.org/10.1006/viro.2001.0867>
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., ... Dotto, G. P. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO Journal*, 20(13), 3427–3436. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.13.3427>
- Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCreedy, D. R., ... Egan, S. E. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Research*, 65(18), 8530–7. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1069>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(November), 105–111. <http://doi.org/10.1038/35102167>
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J. L., & Bigas, A. (2005). RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development (Cambridge, England)*, 132(5), 1117–26. <http://doi.org/10.1242/dev.01660>
- Sánchez-Barriga, J. J. (2012). Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gaceta Medica de Mexico*, 148(1), 42–51.
- Sandy, A. R., & Maillard, I. (2009). Notch signaling in the hematopoietic system. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(11), 1383–98. <http://doi.org/10.1517/14712590903260777>
- Scharenberg, C. W. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507–512. <http://doi.org/10.1182/blood.V99.2.507>
- Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4), 469–79. <http://doi.org/10.1084/jem.20040394>
- Schultz, M. B., & Sinclair, D. A. (2016). When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development*, 143(1), 3–14. <http://doi.org/10.1242/dev.130633>
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9–29. <http://doi.org/10.3322/caac.21208>

- Skloot, R. (2010). *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. Crown/Archetype. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=LBBhikJpLjwC&pgis=1>
- Song, S., Maru, D. M., Ajani, J. A., Chan, C.-H., Honjo, S., Lin, H.-K., ... Mishra, L. (2013). Loss of TGF- β adaptor β 2SP activates notch signaling and SOX9 expression in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Research*, 73(7), 2159–69. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1962>
- Subramanyam, D., & Krishna, S. (2006). c-Myc substitutes for Notch1-CBF1 functions in cooperative transformation with papillomavirus oncogenes, 347, 191–198. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.028>
- Sun, Y., Zhang, R., Zhou, S., & Ji, Y. (2015). Overexpression of Notch1 is associated with the progression of cervical cancer. *Oncology Letters*, 9(6), 2750–2756. Retrieved from <http://www.spandidos-publications.com/ol/9/6/2750/abstract>
- Suprynowicz, F. a, Upadhyay, G., Krawczyk, E., Kramer, S. C., Hebert, J. D., Liu, X., ... Schlegel, R. (2012). Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(49), 20035–20040. <http://doi.org/10.1073/pnas.1213241109>
- Talora, C., Campese, A. F., Bellavia, D., Felli, M. P., Vacca, A., Gulino, A., & Screpanti, I. (2008). Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782(9), 489–97. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.06.008>
- Talora, C., Cialfi, S., Segatto, O., Morrone, S., Kim Choi, J., Frati, L., ... Screpanti, I. (2005). Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Experimental Cell Research*, 305(2), 343–354. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.01.015>
- Talora, C., Sgroi, D. C., Crum, C. P., & Dotto, G. P. (2002). Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes and Development*, 16(17), 2252–2263. <http://doi.org/10.1101/gad.988902>
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., ... Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(1), 13–24. <http://doi.org/10.1096/fj.12-218222>
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778–784. <http://doi.org/10.1038/ncb0901-778>
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., ... Samuelson, L. C. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 139(3), 488–97. <http://doi.org/10.1242/dev.070763>
- Visvader, J. J. E., & Lindeman, G. G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755–68. <http://doi.org/10.1038/nrc2499>
- Vliet-Gregg, P. A., Hamilton, J. R., & Katzenellenbogen, R. A. (2013). NFX1-123 and human papillomavirus 16E6 increase Notch expression in keratinocytes. *Journal of Virology*, 87(24), 13741–50. <http://doi.org/10.1128/JVI.02582-13>
- Vliet-Gregg, P. A., Hamilton, J. R., & Katzenellenbogen, R. A. (2015). Human papillomavirus 16E6 and NFX1-123 potentiate Notch signaling and differentiation without activating cellular arrest. *Virology*, 478, 50–60. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.002>

- Wang, L., Qin, H., Chen, B., Xin, X., Li, J., & Han, H. (2007). Overexpressed active Notch1 induces cell growth arrest of HeLa cervical carcinoma cells, (11), 1283–1292. <http://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.00927.x>
- Wang, M. M. (2011). Notch signaling and Notch signaling modifiers. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(11), 1550–1562. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.08.005>
- Wang, Z., Ahmad, A., Li, Y., Azmi, A. S., Miele, L., & Sarkar, F. H. (2011). Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer Research*, 31(4), 1105–13. Retrieved from <http://ar.iiarjournals.org/content/31/4/1105.abstract>
- Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Banerjee, S., Liao, J., & Sarkar, F. H. (2006). Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 483–93. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0299>
- Ward, E. J., Shcherbata, H. R., Reynolds, S. H., Fischer, K. a., Hatfield, S. D., & Ruohola-Baker, H. (2006). Stem Cells Signal to the Niche through the Notch Pathway in the Drosophila Ovary. *Current Biology*, 16(23), 2352–2358. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.022>
- Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1370), 831–7. <http://doi.org/10.1098/rstb.1998.0247>
- Watt, F. M., & Driskell, R. R. (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 155–163. <http://doi.org/10.1098/rstb.2009.0149>
- Watt, F. M., Estrach, S., & Ambler, C. a. (2008). Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 171–179. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.010>
- Weijzen, S., Zlobin, A., Braid, M., Miele, L., & Kast, W. M. (2003). HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation. *Journal of Cellular Physiology*, 194(3), 356–62. <http://doi.org/10.1002/jcp.10217>
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., ... Aster, J. C. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development*, 20(15), 2096–109. <http://doi.org/10.1101/gad.1450406>
- Wolpert, L. (2009). *Principios del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=HCkurx8FuSgC&pgis=1>
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., ... Kitajewski, J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7403–15. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7403-7415.2001>
- Xiao, M.-J., Han, Z., Shao, B., & Jin, K. (2009). Notch signaling and neurogenesis in normal and stroke brain. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 1(2), 192–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860305/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428478>
- Xu, J., & Gridley, T. (2012). Notch Signaling during Oogenesis in Drosophila melanogaster. *Genetics Research International*, 2012(Type 1), 648207. <http://doi.org/10.1155/2012/648207>
- Yao, J., Zheng, K., Li, C., Liu, H., & Shan, X. (2015). Interference of Notch1 inhibits the growth of glioma cancer cells by inducing cell autophagy and down-regulation of Notch1–Hes-1 signaling pathway.

Medical Oncology, 32(6), 174. <http://doi.org/10.1007/s12032-015-0610-2>

- Yeh, C., Yao, C., Yan, J., Chuang, S., Lee, L., Chen, C., ... Lai, G. (2011). Apoptotic Cell Death and Inhibition of Wnt / β -Catenin Signaling Pathway in Human Colon Cancer Cells by an Active Fraction (HS7) from *Taiwanofungus camphoratus*, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/750230>
- Zacharioudaki, E., & Bray, S. J. (2014). Tools and methods for studying Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1), 173–82. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.029>
- Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., & Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6414–6418. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6414>
- Zare, S., Kurd, S., Rostamzadeh, A., & Nilforoushzadeh, M. A. (2014). Types of Stem Cells in Regenerative Medicine : A Review, 1(3), 1–5. <http://doi.org/10.17795/jssc28471>
- Zhao, D., Mo, Y., Li, M. T., Zou, S. W., Cheng, Z. L., Sun, Y. P., ... Lei, Q. Y. (2014). NOTCH-induced aldehyde dehydrogenase 1A1 deacetylation promotes breast cancer stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5453–5465. <http://doi.org/10.1172/JCI76611>
- Zhao, Z.-L., Zhang, L., Huang, C.-F., Ma, S.-R., Bu, L.-L., Liu, J.-F., ... Sun, Z.-J. (2016). NOTCH1 inhibition enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by targeting head neck cancer stem cell. *Scientific Reports*, 6, 24704. <http://doi.org/10.1038/srep24704>
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 342–50. <http://doi.org/10.1038/nrc798>
- Zweidler-McKay, P. A., He, Y., Xu, L., Rodriguez, C. G., Karnell, F. G., Carpenter, A. C., ... Pear, W. S. (2005). Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*, 106(12), 3898–906. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0355>