



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Efecto del yodo molecular y receptores PPAR γ sobre células troncales de
cáncer cervicouterino.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
M en C. Gabriele Davide Bigoni Ordóñez

Comité Tutor

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Cotutora: Dra. Carmen Aceves Velasco
[Instituto de Neurobiología](#)
Dr. Iván Velasco Velázquez
[Instituto de Fisiología \(Departamento de Neurodesarrollo\)](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PMDCB/175/2019

Bigoni Ordóñez Gabriele Davide
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 14 de enero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Efecto del yodo molecular y receptores PPAR γ sobre células troncales de cáncer cervicouterino**", dirigida por el/la Dr(a). **García Carrancá Alejandro Manuel**.

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

PRESIDENTE	Lizano Soberón Marcela
VOCAL	Chávez González María Antonieta
VOCAL	Montesinos Montesinos Juan José
VOCAL	Velasco Velázquez Marco Antonio
SECRETARIO	Rocha Zavaleta Leticia

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

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de enero de 2019.
COORDINADORA

Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

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

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría del Dr. Alejandro García Carrancá y la Dra. Carmen Aceves en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la División de Investigación Básica en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-SS, sede externa del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

CRÉDITOS

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo y a la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de apoyo a los estudios del posgrado (PAEP).

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México subvención 0253804) y el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Secretaría de Salud (México) en el laboratorio de Virus y Cáncer bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá.

Los estudios de Doctorado dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, fueron apoyados a través de las becas de SENESCYT (Ecuador) y CONACYT (4141259) (México).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutores Dr. Alejandro García Carrancá, Dra. Carmen Aceves por su paciencia, apoyo y todas las aportaciones que hicieron para la culminación de mis estudios como de mi superación académica.

Al Dr. Iván Velasco por sus aportaciones académicas.

A mis amigos del fútbol Pavo, Piña, Paco, Blad, Krouch, Costeño, Quesos, Chitara, Migue, Adrián, Issac por sus palabras, por los momentos tan divertidos que pasamos, por las largas charlas y por el apoyo brindado tanto en la parte personal como en la ciencia durante todos mis años en México.

A Miriam Guido en la parte técnica y en su sincera amistad.

A Rocio Méndez por su amistad y generosidad.

A la Dra. Elizabeth Ortiz por su amistad y que gracias a sus conocimientos logró guiarme para cumplir mis metas y enseñarme muchas cosas para aplicar en mi vida.

A todos mis compañeros del laboratorio que formaron parte de mi vida en el transcurso de éstos años y de los cuales aprendí mucho.

A Lalo por las buenas charlas y aportes en la tesis.

A mis amigos Hugo y Martín, por todos éstos años de amistad, de excelentes conversaciones, de momentos de muchas risas y apoyos.

A Heriberto por su apoyo en el bioterio y en los experimentos con los ratones.

A mis amigos Ángel y Zaira que son personas muy especiales, que me apoyaron en todo momento y las divertidas salidas que tuvimos.

A mi amigos Peter y Vero por tantos años de amistad y por los buenos momento compartidos tanto fuera como en el laboratorio.

DEDICATORIA

Primero a Dios, a las Virgencitas de la Dolorosa y Guadalupe por darme la oportunidad de levantarme cada mañana con salud y fuerzas para cumplir mis metas.

A mi hermana Marisol Bigoni que estuvo a mi lado apoyándome, además de ser una de las pocas personas que creyó en mí siempre y eso en mi corazón, hizo que sienta orgullo y valentía para afrontar mi recorrido en el posgrado.

A mi novia Daniela, que mediante el amor que supo darme en todos éstos años, sus palabras de aliento y todos los momentos que pasamos juntos, me dio tantas fuerzas para luchar ante cualquier adversidad y saber que hay un meta que cumplir. Me enseñó que la distancia no es un impedimento para llevar un relación ya que el amor lo puede todo.

En especial para mi querida mami María Soledad Ordóñez Romero, por ella estoy en México y pude culminar mis estudios; siempre tuvo un amor incondicional en todos los momentos, logrando que luche cada día para superar las adversidades y no me rinda ante nada. Gracias a mi mami soy una persona de bien y si ella no estuviera a mi lado nada de esto hubiera sido posible. No puedo tener mejor madre en el mundo mas que mi mami María Soledad Ordóñez Romero, SUS PALABRAS GUÍAN MIS PASOS.

ÍNDICE.

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 CÁNCER	9
1.1.1 CÁNCER CÉRVICOUTERINO	14
1.1.2 CARCINOGENÉISIS	17
1.2 CÉLULAS TRONCALES	19
1.2.1 TIPOS DE CÉLULAS TRONCALES NORMALES	19
1.2.2 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS	20
1.2.3 MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS	22
1.3 YODO MOLECULAR (I₂)	29
1.3.1 EFECTO DEL YODO MOLECULAR EN CÉLULAS CANCEROSAS	29
1.4 PPARs	30
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GENERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIÓN	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I	72
Bigoni-Ordóñez GD, Ortiz-Sánchez E, Rosendo-Chalma P, Valencia-González HA, Aceves C, García-Carrancá A. Molecular iodine inhibits the expression of stemness markers on cancer stem- like cells of established cell lines derived from cervical cancer. BMC Cancer 2018; 18: 928 [PMID: 30257666 DOI: 10.1186/ s12885-018-4824-5]	
ANEXO II	84
Índice de figuras	

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo una de las causas principales de muerte en las mujeres por lo que las investigaciones, han tratado de comprender si existe alguna población celular responsable para el desarrollo del mismo. En los últimos años, se ha propuesto en los tumores sólidos, la presencia de una subpoblación tumoral denominadas células troncales cancerosas, que tienen el papel de mantener tanto el crecimiento tumoral como permitir al tumor adquirir resistencia a los quimioterapéuticos. Es por eso, que los estudios actuales se han enfocado en la identificación y la eliminación de éstas células en los tumores incluyendo el CaCu. El uso de cultivos en esfera, ha sido una herramienta muy utilizada para obtener un enriquecimiento de células troncales cancerosas en comparación con los cultivos en monocapa.

El yodo molecular (I_2), es un compuesto que ha mostrado un efecto tanto antiproliferativo como apoptótico en algunos modelos de cáncer, sugiriéndolo para el tratamiento en pacientes con ésta enfermedad.

Por lo cuál, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos con I_2 en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa) en cultivos en monocapa y esfera como también su efecto en la tumorigenicidad en un modelo murino.

Los resultados mostraron que la suplementación con 200uM de I_2 inhibe la proliferación en ambos tipos celulares y disminuye su capacidad tumorigénica *in vivo*. Este efecto antineoplásico del I_2 estuvo acompañado por una disminución en la expresión de los marcadores de troncalidad CD49f, CK17, OCT-4, NANOG, SOX2 y KLF4, así como un aumento de la expresión y activación de PPAR γ sugiriendo su mecanismo de acción a través de éstos receptores.

En conclusión, los resultados en conjunto indican un importante efecto del I_2 tanto en células cancerosas como en células con características de troncalidad derivadas de CaCu y su uso potencial para el tratamiento del mismo.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) continues to be one of the leading causes of cancer-death in women, so research has tried to understand if there is a cell population responsible for its development. In recent years, it has been proposed the presence of a tumor subpopulation in solid tumors, called cancer stem cells, which has the role of maintaining both tumor growth and allows the tumor to acquire resistance to chemotherapeutics. That is why current studies have focused on the identification and elimination of these cells in tumors including CC. The use of sphere cultures is a widely used tool to obtain an enrichment of cancer stem cells compared to monolayer cultures.

Molecular iodine (I_2) is a compound that has shown both antiproliferative and apoptotic effects in some cancer models, suggesting that its use could improve the treatment response in patients with cancer.

Therefore, the objective of the present work was to evaluate the effect of the treatments with I_2 in cell lines derived from cervical cancer (HeLa, SiHa) in cultures in monolayer and sphere as well as to analyze its effect in the tumorigenicity in a murine model.

The results showed that supplementation with 200uM of I_2 inhibit proliferation in both cell types and decreases its tumorigenic capacity *in vivo*. This antineoplastic effect of I_2 was accompanied by a decrease in the expression of the stem cell markers CD49f, CK17, OCT-4, NANOG, SOX2 and KLF4, as well as an increase in the expression and activation of PPAR γ suggesting its mechanism of action through these receptors.

In conclusion, together the results indicate an important effect of I_2 both on cancer cells and on cancer stem-like cells derived from CC and its potential use for the treatment of CC.

1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer constituye un problema de salud pública muy importante a nivel mundial. En el 2018, el cáncer causó 9.6 millones de defunciones y 18.1 millones de nuevos casos teniendo una prevalencia mayor en los hombres que en las mujeres. Los cánceres con mayor incidencia fueron el de pulmón, mama, próstata y colon-rectal. La causa principal de muerte por cáncer (18.4% del total de muertes por cáncer), fue la de pulmón siendo la mayoría de las muertes en países menos desarrollados (**Bray F 2018**).

Según la OMS, el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de las células dando como resultado la formación de tumores. Otro concepto nos propone que los cánceres surgen de una serie de mutaciones genéticas que se producen como resultado de la inestabilidad celular y/o la plasticidad inducida por los oncogenes (**Saeg F 2018**).

Los tumores cancerígenos, presentan muchas características comunes que permiten entender su desarrollo (**Hanahan D 2011**) (**Fig 1**), entre las cuales se destacan las siguientes:

- **Mantenimiento de la señalización proliferativa:** Es la capacidad para sostener la proliferación incontrolada. Las células cancerosas, al desregular estas señales, se convierten en dueños de sus propios destinos. Las señales habilitantes se transmiten en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular, que típicamente contienen dominios de tirosina quinasa intracelulares. Este último, procede a emitir señales a través de vías de señalización intracelular ramificadas que regulan la progresión a través del ciclo celular, así como el crecimiento celular. A menudo, estas señales influyen en otras propiedades biológicas celulares, como la supervivencia celular y el metabolismo energético.

Asimismo, esto se manifiesta por la expresión y/o actividad alterada de las proteínas relacionadas con el ciclo celular y la activación constitutiva de muchas vías de transducción de señales también estimula el crecimiento celular (**Feitelson**

MA 2015). La vía molecular PI3K/Akt/mTOR desempeña un papel central en el crecimiento, la proliferación y la supervivencia en las células tumorales y la activación aberrante de mTOR por mutaciones promueve la proliferación de células cancerosas (**Steelman LS 2008; McCubrey JA 2012).**

- **Evasión a los supresores de crecimiento:** Capacidad de eludir los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de las acciones de los genes supresores de tumores (genes que controlan el crecimiento celular). Dos supresores de tumores como la proteína RB (asociadas a retinoblasoma) y p53, funcionan como nodos de control dentro de circuitos reguladores celulares que juegan un papel clave en la determinación del destino de las células para proliferar o alternativamente, activar la senescencia y los programas apoptóticos. Por ejemplo, la eliminación de p53 conduce a la pérdida de los puntos de control del ciclo celular, lo que conlleva a la incapacidad de la célula para detener la acumulación tanto de la inestabilidad genética como de mutaciones y evita reparar eficazmente los errores o daños en el ADN. Además, la proteína p53 tiene un papel importante en la activación de la apoptosis, por lo que su pérdida conduce a la supervivencia inadecuada de las células con nuevas mutaciones (**Amin ARM 2015).**

- **Resistencia a la muerte celular:** Capacidad de evadir la apoptosis. Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común, es la pérdida de la función supresora de tumores de la proteína p53, permitiendo la eliminación de este sensor de daño en los circuitos que inducen apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares al aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL o de las señales de supervivencia como Igf1/2 o al disminuir la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax, Bim o Puma. En los tumores de glioblastoma, se ha detectado niveles altos de expresión de las proteínas antiapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2 demostrando que juegan un rol crucial en la progresión tumoral (**Tagscherer KE 2008).**

- **Inmortalidad replicativa:** Capacidad de división ilimitada. La evidencia indica

que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas están involucrados centralmente en la capacidad de proliferación ilimitada. La telomerasa, es una ADN polimerasa formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad polimerasa que agrega segmentos repetidos de telomero a los extremos del ADN telomérico. Está casi ausente en las células no inmortalizadas pero se expresa a niveles funcionalmente significativos en las células cancerosas humanas. La inmortalización de las células tumorales se ha atribuido a su capacidad para mantener el ADN telomérico en longitudes suficientes para evitar desencadenar la senescencia o la apoptosis, que se logra con mayor frecuencia al aumentar la expresión de la telomerasa. La telomerasa consta de dos componentes, uno ribonucleotídico y otro proteico. Está sobreexpresada en células cancerosas y puede ser regulada a varios niveles. A nivel genético, se detectó el aumento en el número de copias de los genes del componente ribonucleotídico en carcinomas de cabeza y cuello y cervicales **(Soder AI 1997)**.

- **Inducción de la angiogénesis:** Por el cuál obtiene muchos de sus nutrientes para mantener su proliferación. La angiogénesis, permite a los tumores recibir sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. En el adulto, como parte de los procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y en el ciclo reproductor femenino, la angiogénesis se activa, pero solo de forma transitoria. En contraste, durante la progresión del tumor, un "interruptor angiogénico" casi siempre se activa y permanece encendido, lo que hace que la vasculatura normalmente inactiva aparezca continuamente con nuevos vasos que ayudan a sostener la expansión de los crecimientos tumorales.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es una proteína involucrada en la angiogénesis. En adenocarcinomas cervicales, se observó una sobreexpresión de los miembros de la familia VEGF que se correlacionó con una alta intensidad en la formación de nuevos vasos sanguíneos **(Pinheiro C 2015)**.

- **Activación de la invasión y metástasis:** Capacidad de invadir otros tejidos y realizar un proceso de carcinogénesis. La expresión de los genes que codifican

moléculas de adhesión célula a célula y célula a la matrix extracelular, se encuentran desregulados, es decir, pierden su función lo que permite a la célula invadir otros tejidos. Una de las alteraciones mejor caracterizada es la pérdida de la proteína E-cadherina, una molécula clave en la adhesión célula a célula. La pérdida de su expresión en células tumorales, en asociación con otras proteínas, ocurre con frecuencia durante la progresión tumoral y la metástasis. Se cree que al perder su función, las células se disocian del tumor primario, invaden los tejidos circundantes y migran a sitios distantes **(Petrova YI 2016)**.

- **Inestabilidad genómica:** Cada vez que se divide una célula cancerígena, aumenta su acumulación de mutaciones que permite que haya una inestabilidad en los genes, confiriéndole a su progenie ciertas ventajas y una eventual dominancia en el ambiente del tejido en el que se encuentren. La progresión tumoral en varias etapas puede representarse como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales se desencadena por la adquisición al azar de un genotipo mutante habilitante.

La estabilidad genómica es esencial en la integridad celular para evitar errores en la replicación del ADN. Cuando la misma se altera, incluye pequeñas variaciones en la estructura cromosómica, aumento de las frecuencias de las mutaciones en los nucleótidos, cambio en el número de cromosomas o rearrreglos entre los mismos, que todo esto conlleva a las células tumorales adquirir características tumorigénicas y a la progresión tumoral **(Yao Y 2014)**.

- **La desregulación energética celular:** Reprograman su metabolismo energético para obtener de una manera más rápida la energía necesaria para cumplir sus funciones celulares.

Esta desregulación implica una reprogramación metabólica en la que las células cancerosas, incluso en presencia de oxígeno, limitan en gran medida su metabolismo energético a la glucólisis, seguida de la conversión del piruvato en lactato (conocido como el efecto Warburg), en lugar de la utilización del piruvato en la mitocondria para el ciclo de Krebs, una vía metabólica energéticamente mucho más favorable. Para permitir un flujo glucolítico continuo, las células

cancerosas deben promover el flujo de salida del lactato acumulado y lo hacen regulando la sobreexpresión de los transportadores de la membrana plasmática responsables del flujo de lactato: los transportadores de monocarboxilato **(Pinheiro C 2012;2015)**.

- **Evasión a la destrucción inmunitaria:** Los tumores tienen la capacidad de eludir el sistema inmune evitando que puedan ser eliminados. Las células cancerosas altamente inmunógenas (capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica), pueden evadir la destrucción inmune al deshabilitar los componentes del sistema inmunitario que se han enviado para erradicarlos. Por ejemplo, las células cancerosas pueden paralizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos y células natural killer, al secretar el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) u otros factores inmunosupresores. Otro mecanismo para evadir el sistema inmune, es el reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresoras y pueden suprimir las acciones de los linfocitos T citotóxicos.

Se ha demostrado la capacidad inmunosupresora de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) en el cáncer, la cual restringe las reacciones inflamatorias potencialmente dañinas actuando en la degradación del aminoácido triptófano, generando metabolitos del mismo con efectos tóxicos directos en los linfocitos T citotóxicos **(Becker JC 2013)**.

- **Promoción de la inflamación tumoral:** Los tumores reciben biomoléculas como factores de crecimiento que mantienen la proliferación tumoral. La inflamación puede contribuir a múltiples capacidades al suministrar moléculas bioactivas al microambiente del tumor, incluidos los factores de supervivencia que limitan la muerte celular, los factores proangiogénicos, las enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis.

Se ha demostrado que la inflamación crónica está involucrada en varias fases de la tumorigénesis, como la proliferación celular, la transformación, la evasión de la apoptosis, la supervivencia, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Por ejemplo, la inflamación hepática debido a la exposición a agentes infecciosos como el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, representa un paso

temprano en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Samadi AK 2015).

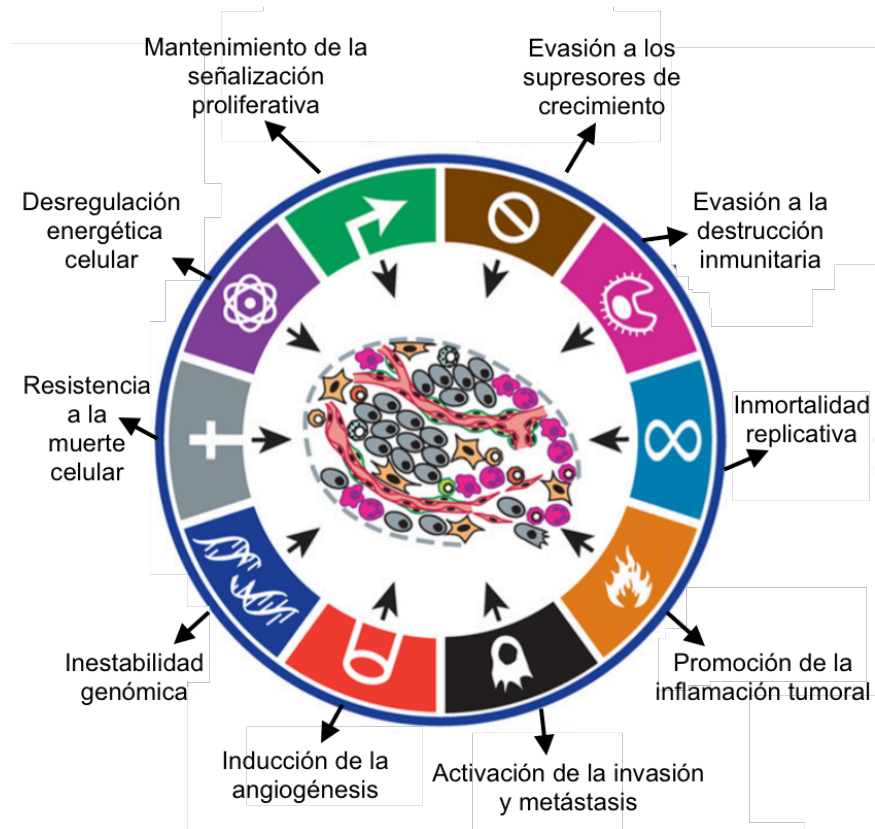


Figura 1.- Características del cáncer. El cáncer comprende diferentes capacidades biológicas que se adquieren durante el desarrollo de múltiples etapas de los tumores humanos (modificado de Hanahan 2011).

1.1.1 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu), ocupó el cuarto lugar como causa más frecuente de cáncer en mujeres a nivel mundial con un estimado de 569,847 nuevos casos y 311,365 muertes en el 2018.

En México, el CaCu fue responsable de 4121 de muertes con una incidencia de 7869 casos y fue la causante del 4,1% del total de muertes por cáncer. En 5 años se estima una prevalencia de éste cáncer de 22,769 casos (Bray F 2018).

El CaCu se caracteriza por iniciar en el cuello uterino y es causado en casi la totalidad de los casos (98%) por infecciones persistentes con el virus del Papiloma Humano (VPH). Mas de 200 VPH han sido identificados, clasificándolos en alto y bajo riesgo de acuerdo a su potencial oncogénico y aproximadamente 40 de ellos

infectan el tractoanogenital (**Muñoz N 2003; de Villiers EM 2004**). Las infecciones por los VPH de alto riesgo principalmente los del tipo 16, 18, 31, 45, se asocian con una serie de cambios celulares que llevan a la progresión de un tejido normal hasta el desarrollo de un carcinoma in situ, que posteriormente, puede convertirse en una lesión invasiva (**Khan JM 2005**) (**Fig 2**).

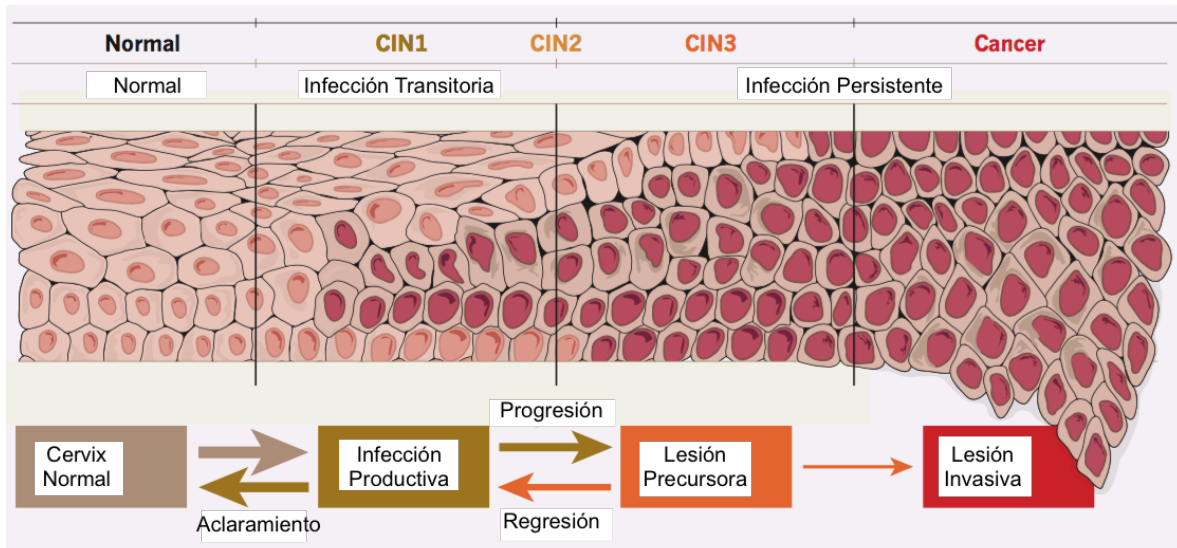


Figura 2.- Modelo de desarrollo del cáncer cervicouterino. La infección persistente por VPH a través del tiempo puede llevar al desarrollo de un carcinoma in situ. CIN1: neoplasia intraepitelial cervical de grado 1, CIN2: neoplasia intraepitelial cervical de grado 2, CIN3: neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 (**modificado de Crow 2012**).

Los VPH son virus pequeños, con cápside icosaédrica de aproximadamente 55 nm de diámetro, formada por 72 capsómeros y dentro de la cual se encuentra el genoma viral, constituido por un ADN de doble cadena y estructurado en forma de cromatina al igual que el ADN celular. El genoma de los VPHs codifican para 8 proteínas, 6 de expresión temprana (E) y 2 de expresión tardía (L) las cuales cuentan con una región no codificadora (LCR), donde se localiza el origen de replicación (**Fig 3**).

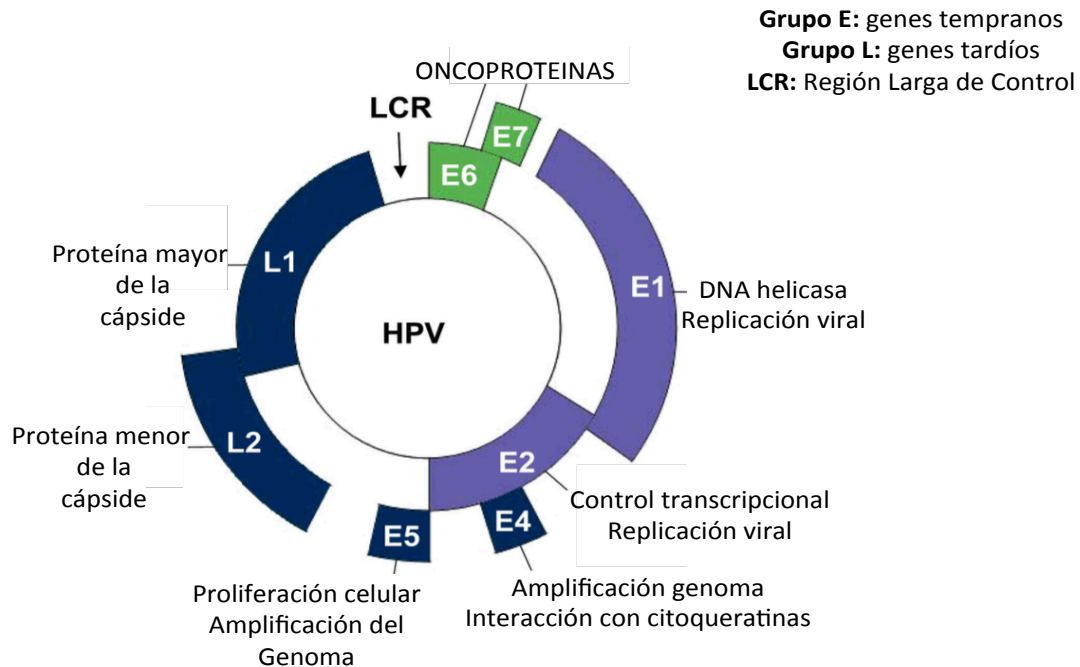


Figura 3.- Organización genómica de los virus del papiloma humano. Los VPH codifican una serie de proteínas involucradas en la replicación y formación de nuevos viriones (**modificado de D' Abramo 2011**).

La gran mayoría, si no todos los tumores del cuello uterino y líneas celulares derivadas de estos (HeLa, SiHa), contienen los genes virales E6 y E7, descritos como los responsables del proceso de transformación de las células. Una vez que el ADN viral se integró a la célula huésped, hay una pérdida de la proteína E2 del virus (encargada de la regulación transcripcional de las oncoproteínas) y como consecuencia se sobreexpresan las proteínas virales E6 y E7.

Una de las funciones principales de la oncoproteína E6 es inducir la degradación de p53, bloqueando así su función lo cual, a su vez, induce inestabilidad genómica cuando se expresa de forma continua. Una de las funciones de p53 es la de detener el ciclo celular en el punto de control G1/S o G2/M, cuando existe daño en el ADN, para evitar su replicación o segregación incorrecta. Si el daño en el ADN es irreparable, para evitar la proliferación de las células que lo contienen, p53 activa la expresión de genes pro-apoptóticos como BAX o PUMA llevando a la apoptosis celular (**Zur H 1991**).

La oncoproteína E7 se une con la forma activa de la proteína del retinoblastoma (pRB) hipofosforilada. La función de pRB en la célula consiste en regular el ciclo celular. Otra función de pRB es unirse a factores activadores de la transcripción celular, impidiendo que estos actúen. Al unirse E7 con pRB, algunos de estos activadores quedan libres, iniciándose procesos de transcripción celular.

La oncoproteína E7 también al unirse con pRB hace que la misma pierda su función reguladora del ciclo y permite que la célula pueda entrar en fase S. De ésta forma, las células del estrato suprabasal son inducidas a permanecer más tiempo en un estado permisivo para la división celular, con lo cual hay disponibilidad de la maquinaria de replicación del ADN quedando accesible al virus a fin que pueda utilizarla **(Dyson N 1989)**.

1.1.2 Carcinogénesis

Se lo conoce como un proceso por el cual una célula adquiere la capacidad de multiplicarse incontroladamente, evadir la muerte celular y la posibilidad de llegar a invadir otros órganos del cuerpo.

Sabemos que los tumores, están conformados por una heterogeneidad celular y se ha tratado de explicar el proceso de carcinogénesis a través de varios modelos **(Fig 4)**.

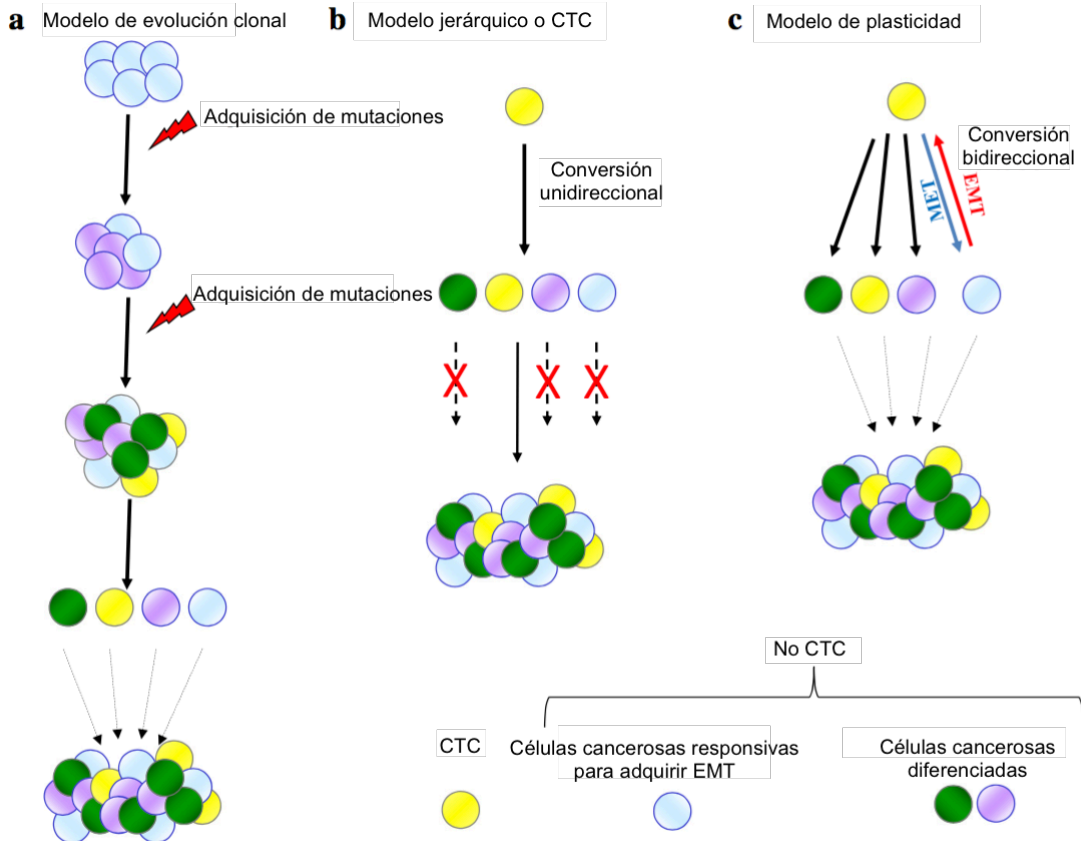


Figura 4.- Modelos de heterogeneidad tumoral. a. Modelo de evolución clonal. Todas las células tienen la misma capacidad tumorigénica. **b. Modelo Jerárquico o CTC.** Solo una pequeña subpoblación tiene capacidad tumorigénica. **c. Modelo de plasticidad.** Las células diferenciadas o no cancerosas pueden adquirir características de CTC que les permiten tener capacidad tumorigénica (modificado de Jayachandran 2016).

El primer modelo, denominado de evolución clonal, propone que todas las células que conforman un tumor tienen la misma capacidad de formar de tumores y esto es debido a que todas las células sufren cambios moleculares que les confiere a todas propiedades tumorigénicas (Nowell PC 1976). El segundo modelo denominado jerárquico o de células troncales cancerosas (CTC), propone que sólo unas pocas células conocidas como CTC, tienen la capacidad para autorrenovarse, dar una progenie altamente proliferativa, mantener la formación tumoral e invadir otros tejidos (Bonnet D 1997; Jordan CT 2006). Este modelo sugiere que la célula troncal cancerosa proviene de una célula, que a través del tiempo acumula mutaciones y en cierto momento se transforma, volviéndose

tumorigénica. El tercer modelo denominado de plasticidad, propone que cualquier célula madura puede sufrir mutaciones en genes que les permiten desdiferenciarse, específicamente una de las capacidades que obtienen es la de transición epitelio-mesénquima (EMT), por la cual adquieren características troncales. A través de EMT, las células cancerosas parecen adquirir una capacidad de autorrenovación, similar a la exhibida por las células troncales y capacidad para generar metástasis. Esto plantea la posibilidad, de que el proceso EMT, que permite la diseminación de las células cancerosas, a su vez, pueda impartir una capacidad de autorrenovación para diseminar las células cancerosas. Éste proceso sugiere también, que las células recién desdiferenciadas adquieran propiedades malignas (**Morel AP 2008; Biddle A 2012; Mani SA 2008**). Un estudio demuestra la adquisición de ésta capacidad de plasticidad por parte de las células, al usar varios agentes anticancerígenos en líneas celulares de tumores humanos sensibles a los medicamentos, detectando una pequeña subpoblación de células que se volvieron tolerantes a los medicamentos, adquiriendo una característica de las CTCs que es la de ser quimioresistentes (**Sharma SV 2010**).

1.2 Células troncales

Las células troncales son todas aquellas células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovarse, generando copias idénticas de ellas, con potencial para formar células maduras de un linaje particular. En prácticamente todos los tejidos existe un reservorio limitado de células troncales cumpliendo funciones tanto de sistema de reparación para el tejido dañado como proporcionando nuevas células que contrarrestan la pérdida de células durante la renovación del tejido (**Daley GQ 2015; Vapniarsky N 2015**).

1.2.1 Tipos de células troncales normales

De acuerdo a su potencial de diferenciación se han clasificado en:

- **Células totipotentes:** pueden formar un organismo completo, formar células de los tres linajes embrionarios y también los extraembrionarios (como la placenta).

- **Células pluripotentes:** no pueden formar un organismo completo, pero si cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios.
- **Células multipotentes:** son aquellas que sólo pueden generar células de su mismo linaje embrionario.
- **Células unipotentes:** son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse en sólo un tipo de células.

De acuerdo a su origen son clasificadas en:

- **Células Embrionarias:** Son células pluripotentes provenientes del blastocito. Tienen la capacidad de formar las tres líneas germinales.
- **Células Adultas:** Son células que se encuentran en los tejidos adultos, sólo pueden formar y diferenciarse en células del tejido al cual pertenecen.

1.2.2 Células troncales cancerosas

Las CTCs son una pequeña subpoblación de células que forman parte del tumor, se ha sugerido sean las responsables de la formación tumoral, tener capacidad metastásica (poder invadir otros tejidos), resistentes a los medicamentos y dar como resultado una progenie con alta capacidad proliferativa para mantener el crecimiento de la masa tumoral (**Lapidot T 1994; Jordan CT 2006**).

Las células tienen la capacidad de auto-replicarse muchas veces y esto se logra a través de la autorrenovación. Ésta división celular, puede irse a través de dos divisiones, una simétrica, donde se generan dos células hijas con propiedades de células troncales idénticas a la célula parental, mientras que una división asimétrica genera una célula hija con propiedades de célula troncal y otra célula hija progenitora que al diferenciarse, constituirá las células maduras que forman los distintos tejidos (**Liu A 2013**).

Un desequilibrio en la división simétrica y asimétrica pueden provocar cáncer debido a mutaciones en los reguladores de la división asimétrica. Es probable que la división asimétrica, contribuya en las distintas etapas del desarrollo del tumor y en diferentes eventos oncogénicos (**Bajaj J 2015**). También existe la evidencia de que la frecuencia de aparición de tumores en distintos tejidos humanos es

consecuencia directa del número de divisiones que sufren las células troncales normales de esos tejidos en particular y que la autorrenovación es el parámetro clave para la aparición de resistencia en las poblaciones de células cancerosas **(Tomasetti C 2015; Stiehl T 2017)**.

En 1994, se demostró por primera vez la presencia de CTCs, específicamente en la leucemia mieloide aguda (LMA) humana basada en la expresión de marcadores de superficie. Estas células eran $CD34^+/CD38^-$, las cuales tenían una alta capacidad de proliferación y funcionalmente podían establecer leucemia humana en ratones inmunosuprimidos en comparación de células que eran $CD34^-$ **(Lapidot T 1994)**. La segunda evidencia de la presencia de CTCs se comprobó en tumores sólidos. Las células derivadas de tumores gliales en condiciones de cultivos especiales, tenían la capacidad de formar clonas y presentaban características similares a las células troncales neuronales (NSC), proponiendo que una NSC anormal podría contribuir al crecimiento de los tumores gliales cerebrales humanos **(Ignatova TN 2002)**. En otro estudio, utilizando muestras derivadas de tumores de mama, una población celular inmunofenotípicamente $CD44^+/CD24^{-/bajo}/Linaje^-$, experimentó un proceso de autorrenovación, diferenciación al igual que las células troncales normales y a su vez presentaban características proliferativas y tumorigénicas. En éste estudio, demostraron que éstas células lograban recapitular la enfermedad en ratones inmunosuprimidos y se mantuvo la capacidad de formación de tumores al realizar trasplantes seriados **(Al-Hajj M 2003)**.

El estudio de las CTCs ha ido en aumento por lo que la aplicación de metodologías correctas para su aislamiento y enriquecimiento (aumento en el porcentaje de éstas células), se han vuelto muy importantes **(Duan JJ 2013)**.

La citometría de flujo, es un método excelente donde a través del uso de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos tanto de membrana como intracelulares han permitido caracterizar a las células troncales normales y cancerosas. Otra ventaja de ésta metodología, es permitir aislar pequeñas poblaciones de una manera eficaz y rápida **(Stewart C 2000; Greve B 2012)**.

Otra metodología para obtener un enriquecimiento de células troncales en comparación a cultivos en monocapa, es la formación de cultivos en esferas. Éstos cultivos consisten en cultivar células en condiciones no adherentes con factores de crecimiento específicos para permitir que las células troncales proliferen. El mismo ha sido un buen sistema para evaluar las características relacionadas con CTCs de tumores sólidos *in vitro* **(Ishiguro T 2017)**.

Un estudio en diferentes tumores cerebrales, demostraron la presencia de células troncales cancerosas a través de la formación de neuroesferas. Se comprobó que sólo una pequeña población tenía la capacidad de autorrenovarse, así como una alta capacidad de proliferación y expresaban el marcador CD133 **(Singh KS 2003)**.

El uso de éstos cultivos también sirvieron para el estudio de otros tumores sólidos como mama, próstata, colon, pulmón **(Ponti D 2005; Collins AT 2005; Ricci-Vitiani L 2007; Eramo A 2008)**.

Los sistemas animales siguen siendo el enfoque más confiable para evaluar el potencial tumorigénico de las células en cultivo **(Petricciani JC 1974)**. El ensayo de trasplante de tumor en serie es el "estándar de oro" actual para identificar CTCs, porque puede evaluar la autorrenovación. El ensayo de dilución limitante (un número de células bajo) se puede usar en combinación con trasplantes en serie para evaluar las propiedades de las CTCs en una población de células tumorales con posibles marcadores positivos de troncalidad **(Rycaj K 2015)**. Estos ensayos han demostrado la existencia de CTCs en cánceres humanos que incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), cáncer de mama, glioblastoma, cáncer colorrectal y otros **(Lapidot T 1994; Kreso A 2014)**.

Por la gran utilidad de éstas tres metodologías, se aplicaron las mismas en el presente trabajo.

1.2.3 Marcadores de células troncales cancerosas

Se ha tratado de aislar células troncales normales y cancerosas a través de la expresión de varios marcadores, específicamente la identificación de poblaciones positivas para la integrina CD49f y una proteína del citoesqueleto como

citoqueratina 17 (CK17) han sido propuestos como marcadores para aislar a ésta subpoblación.

Las integrinas están divididas en dos familias, la α (alfa) y β (beta) que al unirse pueden formar al menos 26 receptores heterodímeros.

CD49f también conocida como alfa 6 integrina, pertenece a las integrinas de la familia alfa y se encuentra en la membrana celular. Las integrinas son receptores transmembranales heterodímeros, cuya función es la de intervenir en las uniones de las células con la matriz extracelular, las uniones célula-célula como también juegan un papel importante en la migración y diferenciación celular **(Watt FM 2002)**.

Se ha comprobado, que células con una alta expresión de CD49f poseen características de troncalidad. Según una investigación, se propuso a CD49f como un marcador de células troncales de glioblastoma, ya que al aislarlas en conjunto con otros marcadores de troncalidad presentaron tanto *in vitro* como *in vivo* capacidad de autorrenovación, formación de tumores y alta capacidad tumorigénica en comparación directa con su contraparte que expresaba poca cantidad del mismo y no cumplía con la definición funcional de células troncales de glioblastoma **(Lathia DJ 2010)**.

Al usar queratinocitos primarios humanos con características de troncalidad, se demostró presentaban un alta expresión de CD49f con capacidad de formación colonias y un alto grado de proliferación **(Webb A 2004)**.

Asimismo, se ha estudiado la presencia de células con características de troncalidad utilizando el método de formación de esferas usando cuatro líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C-4I). El análisis de expresión diferencial de estas células y su contraparte (crecidas de forma tradicional en monocapa), mostró la expresión de marcadores característicos de células troncales como CD49f, el cual se correlaciona con marcadores de transición epitelio mesénquima como vimentina además de poseer propiedades de radioresistencia **(López J 2012; Ortiz E 2016)**.

En líneas celulares de cáncer de colon (HT29, Caco2) reevaluaron los marcadores de troncalidad aislando las células que expresaban CD133, CD44 en conjunto con

CD49f y las inyectaron a ratones inmunosuprimidos. Con esto demostraron, que las líneas celulares de cáncer de colon que expresaban simultáneamente CD133, CD44 y CD49f, tenían la capacidad de ser tumorigénicas en comparación de las que sólo expresaban CD133 y CD44, por lo cual CD49f se volvió un importante marcador para aislar células cancerígenas con características de troncalidad **(Naotsugu H 2013)**.

Por todo esto, se sugiere a CD49f como un marcador transmembranal para identificar células troncales cancerosas, ya que las células inmunofenotípicamente positivas para el mismo demuestran tener propiedades de autorrenovación y alta capacidad tumorigénica en comparación a su contraparte CD49f^{low/-} **(Bigoni GD 2018)(Fig 5)**.

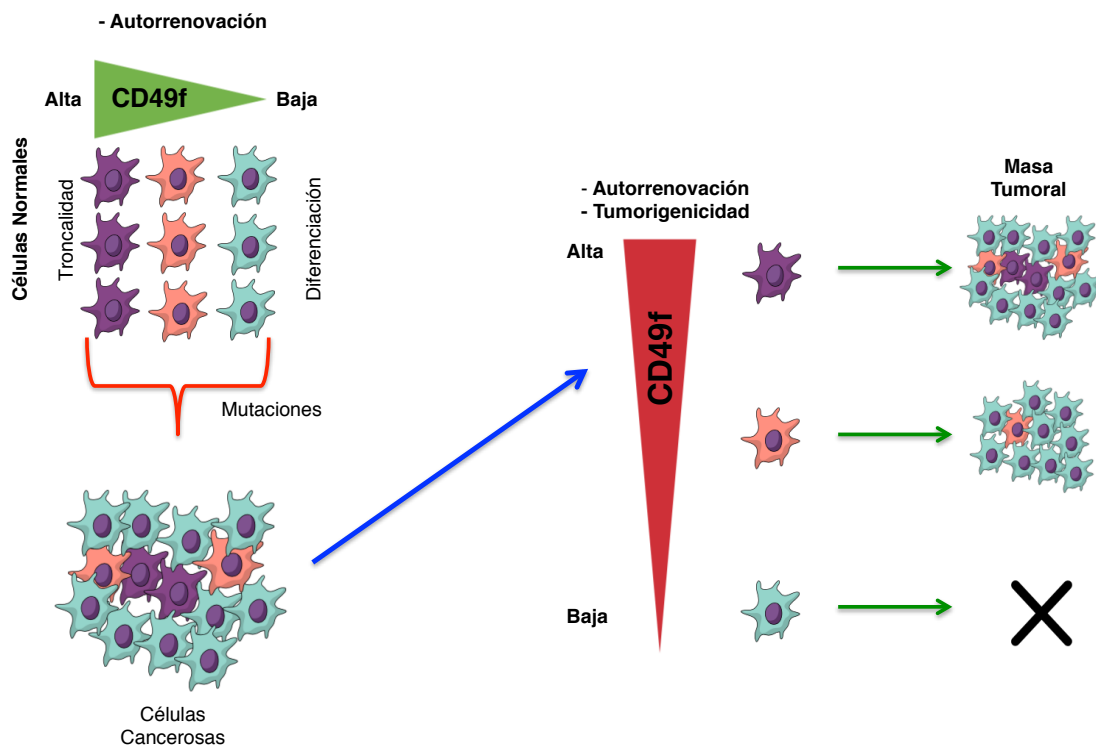


Figura 5.- Modelo esquemático que correlaciona la expresión de ITGA6 (CD49f) con la capacidad troncal y tumorigénica de las células. ITGA6 (CD49f) es altamente expresado en células troncales somáticas y cancerosas lo que permite su aislamiento basado en altos niveles de expresión de CD49f. En un entorno tumoral, los niveles altos de CD49f a menudo se asocian con un aumento de la capacidad tumorigénica y de autorrenovación. Por el contrario, la ausencia de CD49f en células cancerosas se asocia con una incapacidad para inducir la formación de tumores **(modificado de Bigoni 2018)**.

Tan sólo un marcador no es suficiente para aislar a la población troncal, es necesario identificar otros marcadores que se expresen en las capas basales del epitelio glandular del cérvix donde se presume se encuentren las células troncales. Las citoqueratinas, son proteínas que forman parte de las células epiteliales, mantienen la integridad celular y su expresión depende del grado de diferenciación que vaya adquiriendo la población celular. Hay citoqueratinas que se expresan en las capas basales como la CK17, CK14, y a través de inmunohistoquímica, se detectó la expresión de CK17 en las células de reserva cervicales donde se presume se encuentra la población de células troncales (**Smedts F 1992**).

También se demostró, que las células de la capa basal y células indiferenciadas en epitelio cervical precanceroso expresaban CK17 (**Martens JE 2004**).

En muestras de cérvix tanto normales como de lesiones intraepiteliales y en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino, se propuso a CK17 como un marcador para identificar células troncales cancerosas de cérvix (CTCC) en condiciones selectivas de células troncales particularmente en la formación de cultivos en esferas (**Feng D 2009; Ortiz E 2016**).

Asimismo, para la identificación de CTCC, se ha realizado el análisis de NANOG, OCT4, SOX2 Y KLF4, factores de transcripción involucrados en el circuito de mantenimiento de la pluripotencia (capacidad de una célula troncal para diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales ectodermo, mesodermo y endodermo), como la autorrenovación en células embrionarias y que regulan tanto la expresión de los otros factores como de ellos mismo (**Fig 6**).

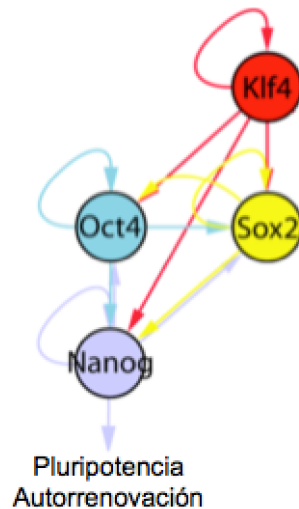


Figura 6.- Red reguladora transcripcional. Los 4 factores de transcripción se autorregulan y son los responsables en mantener la pluripotencia en células embrionarias. Las flechas indican su manera de regulación transcripcional (**modificado de Kim J 2008**).

NANOG pertenece a la familia de homeoproteínas, denominadas así, por poseer la característica de presentar un homeodominio, que es un dominio de unión al ADN. Tiene una función esencial en la proliferación, autorrenovación y pluripotencia de las células troncales embrionarias y se ha demostrado que su sobreexpresión por si sola es capaz de mantener las características antes mencionadas y evitar la diferenciación de las células troncales embrionarias bajo condiciones de cultivo que inducen la diferenciación (**Chambers I 2003; Mitsui K 2003**). En una línea celular derivada de cáncer prostático (Du145) y de cáncer de mama (MCF7), la sobreexpresión de NANOG promovió características de CTC, el aumento del crecimiento clonal y la capacidad de regeneración de los tumores *in vivo* (**Collene RJ 2011**).

Utilizando la línea celular SiHa derivada de cáncer cervicouterino, se demostró que NANOG participa en el desarrollo tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriéndolo como un marcador de progresión del cáncer cervicouterino (**Gu TT 2012**).

OCT4 (factor de transcripción 4 de unión a octámero) o también denominado como POU5F1 por presentar un dominio POU, de clase 5 y factor de transcripción

1, pertenece a la familia POU y es un gen regulador clave que mantiene las propiedades tanto de pluripotencia como la autorrenovación de las células troncales embrionarias.

Se comprobó que OCT4 está aumentado en carcinomas cervicales e invasivos en comparación con tejido normal cervical. Asimismo, la sobreexpresión del mismo en dos líneas celulares derivadas de CaCu potenció la propiedad de formación de tumores *in vivo*. De acuerdo a éste estudio, se sugiere que la expresión de OCT4 esté involucrado en el desarrollo y progresión de éste tipo de cáncer **(Wang YD 2013)**.

SOX 2 es un miembro de la familia SRY (región Y sexo determinante) HMG-box. Contienen un dominio característico denominado grupo de alta movilidad que se une al ADN de una manera específica. Siendo un factor de transcripción como NANOG y OCT4, es también esencial en el mantenimiento de la autorrenovación y pluripotencia de las células troncales embrionarias.

Se ha observado que SOX2 está sobreexpresado en cáncer de pulmón de células escamosas humanas y al usar un modelo de ratón sobreexpresando éste factor, se comprobó que el mismo conduce a hiperplasia distal y produce cáncer **(Lu Y 2010)**.

KLF4 es un miembro de la familia de factores de transcripción denominados Krüppel (KLF). Es un factor de transcripción de tipo 4 que contiene dedos de zinc, los cuales le permiten regular la proliferación, la diferenciación, el desarrollo y la muerte celular programada. Como los factores de transcripción mencionados anteriormente, KLF4 es también esencial para la autorrenovación de las células troncales embrionarias **(Li Y 2005)**.

Se ha encontrado estos factores expresados en tumores malignos humanos, siendo relevantes para la tumorigenicidad y autorrenovación de células troncales cancerosas **(Sarkar A 2013; Amini S 2014)**.

Es por eso que al analizar la presencia de éstos factores en nuestros cultivos, contribuirán mas aún en la identificación de nuestra población de CTCCs.

En la actualidad, la recidiva tumoral y la resistencia a los tratamientos tumorigénicos por parte del cáncer, sugieren es debido a la presencia de CTCs

(Gupta PB 2009; Schulenburg A 2015). Éstas células, demuestran ser quimio-resistentes porque logran expulsar fármacos de una manera más eficiente. La activación de los transportadores ABC, es un mecanismo que emplean la CTCs para la expulsión de sustancias y éstas se encuentran sobreexpresados en las mismas. La proteína ALDH1, miembro de la superfamilia de enzimas dependiente de NADP⁺, es otro mecanismo conocido involucrado en la desintoxicación y autodefensa de los CTCs. La ALDH1 funciona al catalizar la conversión de los aldehídos en ácidos carboxílicos, que se acumulan como resultado de la quimioterapia, la radiación u otras fuentes de estrés oxidativo. A través de estos mecanismos, las CTCs establecen resistencia contra los agentes quimioterapéuticos y otras terapias dirigidas por vía molecular (Cojoc M 2015; Lv X 2016). Todo esto, nos destaca la importancia de considerar como blanco a ésta subpoblación tumoral para la búsqueda de agentes terapéuticos, ya que los fármacos actuales, afectan sólo las células cancerosas en general (Fig 7).

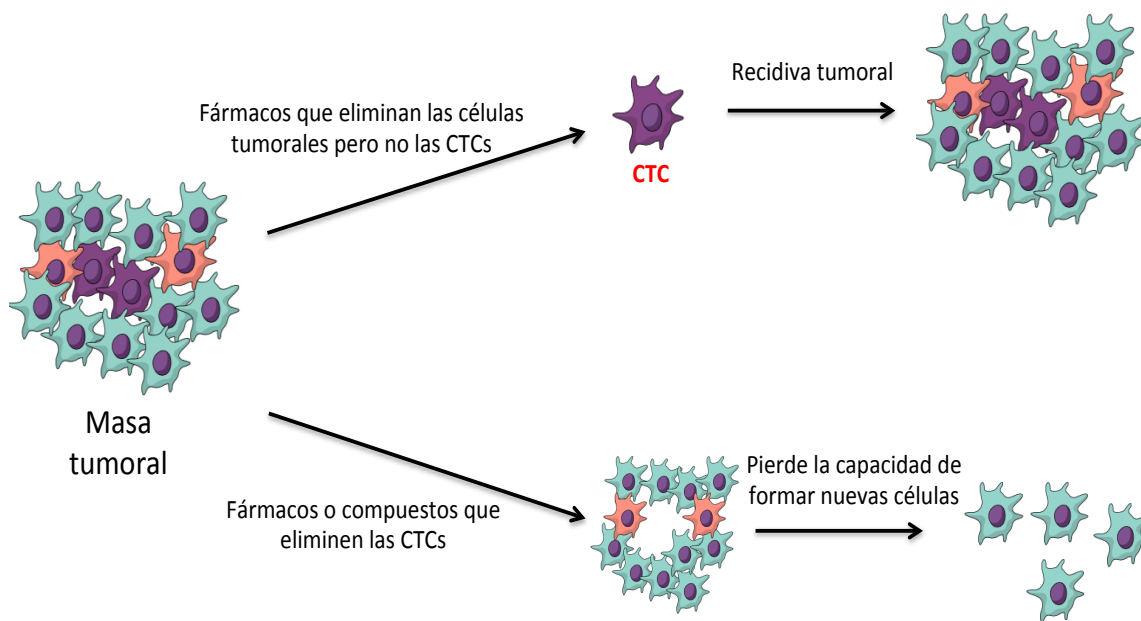


Figura 7.- Tratamientos actuales contra el cáncer. Los fármacos eliminan las células del tumor pero no afectan a las CTCs por lo que permanecen en los tejidos y al pasar el tiempo se puede tener una recidiva tumoral. Al utilizar compuestos o fármacos que tengan como blanco a las CTCs, se perdería la capacidad de formar nuevas células cancerosas por lo que se eliminaría el tumor.

1.3 Yodo molecular (I₂)

El yodo es un elemento químico que se obtiene a partir de los yoduros I⁻, presentes en el agua de mar y en las algas. Es fundamental para la función de la glándula tiroidea ya que sin ella no se podrían producir hormonas tiroideas. La captación de yodo en los tirocitos es un proceso específico a través de una proteína que se encuentra en la membrana plasmática denominada cotransportador de sodio-yoduro (NIS, Na⁺/I⁻ symporter). El NIS transporta de forma activa yodo junto con 2 átomos de sodio al interior de la célula por la membrana basolateral, siendo la fuerza impulsora para el proceso, el gradiente de Na dirigido hacia el interior generado por la Na-K-ATPasa. La enzima tiroperoxidasa (TPO) que se encuentra en la membrana apical, actúa sobre el yodo la cual lo oxida, posteriormente es incorporado a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg) y finalmente cataliza el acoplamiento de 2 residuos de tirosina yodados que serán posteriormente las hormonas tiroideas y este proceso se lo conoce como organificación del yodo **(De La Vieja A 2000; Riesco EG 2008)**.

Las comunidades asiáticas tienen como un importante componente dietético el consumo de algas marinas, siendo éstas una fuente rica de yodo en varias formas químicas, entre ellas el yodo molecular (I₂). La ingesta elevada de yodo en estas comunidades (25 veces más en promedio), en comparación con otros países como Estados Unidos e Inglaterra, se le ha asociado a una baja incidencia de cáncer mamario y prostático **(Cann AS 2000)**. No se conoce exactamente la manera de internalización del I₂ a la célula, pero se sugiere su paso a través de un sistema de difusión facilitada dependiente de síntesis de proteínas e independiente de NIS **(Kupper FC 1998; Arroyo-Helguera O 2006)**.

1.3.1 Efecto del yodo molecular en células cancerosas

Desde los años 80s se describió que dosis moderadamente altas de yodo generan en la tiroides con bocio, la formación de lípidos yodados con acción antiproliferativa y/o apoptótica. Los yodolípidos más estudiados son: el derivado del ácido araquidónico yodado conocido como 6-yodolactona (6-IL) y el 2-yodohexadecanol **(Langer R 2003)**.

El I₂ consiste en una molécula compuesta por dos átomos de yodo. En años recientes se ha demostrado su acción antiproliferativa y con efectos apoptóticos en varias líneas celulares cancerosas a través de la yodolactonización o formación de lípidos yodados (**Rosner H 2009; Vitale M 2000; Arroyo-Helguera O 2008**).

La yodolactonización es una reacción química que produce un anillo de lactona mediante la adición de oxígeno y yodo generalmente en posiciones de doble enlace carbono=carbono de los ácidos grasos insaturados. El más abundante de estos lípidos es el ácido araquidónico presente en las membranas celulares y precursor de diversos mensajeros intracelulares como las prostaglandinas (**Nava-Villalba M 2014**).

Se sugiere que el efecto específico del I₂ sobre células cancerosas se deba a la elevada concentración de ácido araquidónico en el tejido tumoral versus los tejidos normales (**Rillema JA 1978; Wicha MS 1979; Rolland PH 1980; Baron A 2004; Yang P 2012**).

Entre los mecanismos celulares propuestos del I₂ se describe un componente rápido oxidante/antioxidante que ejerce su efecto directo mediante la disminución en el potencial membranar mitocondrial (**Rosner H 2009**) y otro que involucra la activación de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (**Nuñez Anita RE 2011**).

1.4 PPARs

Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares que incluyen receptores para esteroides, hormonas tiroideas, ácido retinoico X y vitamina D.

El mecanismo de acción de los PPARs es muy similar a otros miembros de receptores nucleares. El receptor se une a su ligando, forma un heterodímero con el receptor retinoico X (RXR) y como un complejo se trasloca al núcleo. Una vez en el núcleo, estos heterodímeros se unen a regiones específicas de DNA llamadas elementos de respuesta de proliferadores de peroxisomas (PPRE) que se encuentran dentro de regiones del promotor del gen (**Mansure JJ 2009**).

Estos receptores, originalmente descritos como reguladores del metabolismo de lípidos también juegan un papel importante en la proliferación celular,

diferenciación y apoptosis en la mayoría de las células tanto normales como cancerosas **(Michalik L 2004)**.

Se han identificado tres isoformas de PPARs los cuales son codificados por diferentes genes, la isoforma alfa, la isoforma beta/delta y la isoforma gamma.

La isoforma alfa es un regulador del metabolismo de los lípidos en el hígado; es activado bajo condiciones de privación de energía y necesario para el proceso de la cetogénesis **(Kersten S 1999)**.

La isoforma beta está involucrada esencialmente en la diferenciación de los queratinocitos y tiene un efecto antiinflamatorio **(Schmuth M 2004)**.

La isoforma gamma juega un rol importante en la diferenciación de los adipocitos y en la modulación de la sensibilidad de las células hacia la insulina **(Hamm JK 1999)**.

La multiplicidad de funciones de los PPARs ha generado una serie de reportes en principio contradictorios: en algunos estudios la activación de los mismos está relacionado con la carcinogénesis en donde la expresión de la isoforma alfa está relacionada con la formación de hepatocarcinomas en ratones **(Corton JC 2000)**.

Por el contrario, en estudios en cánceres humanos de próstata, mama y adenocarcinoma endometrial, la expresión de la isoforma beta está directamente asociada con estados patológicos avanzados de los tumores y con un mayor riesgo de recidiva tumoral o metástasis a distancia **(Abdollahi A 2007)**.

En estudios clínicos se ha descrito que los PPAR γ están sobreexpresados en cáncer de próstata en contraste con su tejido normal pero que su activación con agonistas sintéticos genera la inhibición del crecimiento celular tumoral **(Segawa Y 2002)**.

En líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, BT474 y T47D, ligandos de PPAR γ como TGZ, 15d-PGJ2 e indomecatina inhiben la proliferación celular **(Elstner E 1998)**.

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de acción del I₂ es a través de la activación de los PPAR γ **(Nava-Villalba M 2014) (Fig. 8)**, por lo que se ha propuesto el siguiente modelo:

El yodo molecular es internalizado por difusión facilitada y se une al ácido araquidónico formando la 6-IL. Este yodolípido se une al receptor de PPAR γ y junto con el receptor retinoide X (RXR) son llevados al núcleo para activar genes que potencialmente están involucrados en diferenciación, antiproliferación, angiogénesis y de inducción de apoptosis

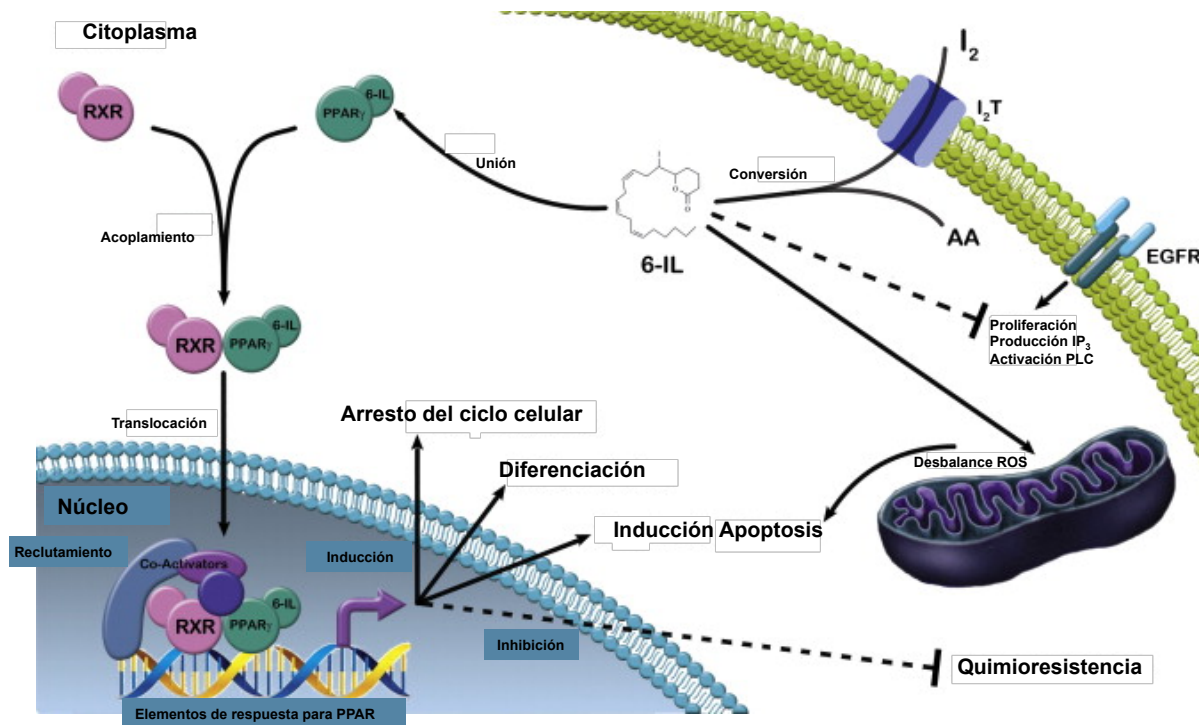


Figura 8.- Mecanismo del yodo molecular. El suplemento de yodo molecular se incorpora a la membrana de la célula mediante difusión facilitada y se une con moléculas de ácido araquidónico (AA) para generar 6-IL. Este yodolípido podría actuar a dos niveles: alcanzar directamente la membrana de las mitocondrias y activar el mecanismo apoptótico como resultado del desequilibrio de ROS (especies reactivas de oxígeno); y/o acción indirecta, mediante el ligando 6-IL con receptores PPAR/RXR que activan la detención del ciclo celular, la diferenciación y la inducción apoptótica, y restringen la instalación de quimioresistencia (Modificado de Nava-Villalba M 2014).

2. HIPÓTESIS

El I₂ reducirá la expresión de proteínas involucradas en la troncalidad y autorrenovación de las CTCs de las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino a través de la activación de los receptores PPAR γ permitiendo disminuir su capacidad tumorigénica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del yodo molecular y receptores PPAR γ sobre células troncales de cáncer cervicouterino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cultivos de células enriquecidas en marcadores propuestos como fenotipo de células troncales de las líneas celulares SiHa y HeLa.
- Evaluar la expresión de los factores de transcripción OCT4, SOX2, NANOG y KLF4 en cultivos de esfera y en monocapa que han sido expuestos a tratamiento con y sin I₂.
- Evaluar la expresión de los marcadores CD49f y CK17 en cultivos de esfera y en monocapa que han sido expuestos a tratamiento con y sin I₂.
- Evaluar la expresión del gen PPAR γ a nivel de proteína en cultivos de esfera y en monocapa con y sin tratamiento con I₂.
- Evaluar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 en cultivos de esfera y en monocapa que han sido expuestos a tratamiento con y sin I₂.
- Evaluar el efecto del I₂ sobre el comportamiento tumorigénico de los cultivos en células enriquecidas en marcadores propuestos como fenotipo de células troncales de la línea celular HeLa.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

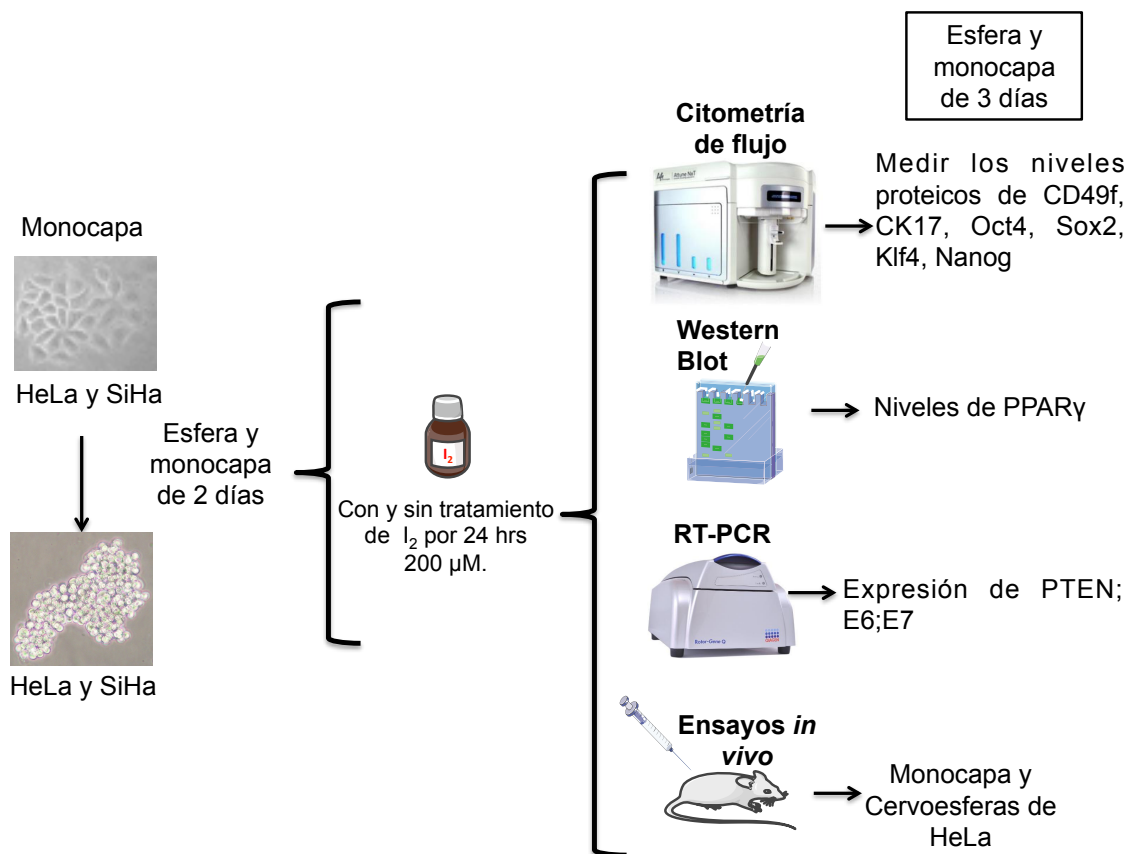


Figura 9.- Diseño experimental. Se evaluaron los niveles proteicos de CD49f, CK17, Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 con y sin tratamiento con I₂ en cultivos de monocapa y esfera de las líneas celulares HeLa y SiHa. Se evaluó el nivel de expresión de PPARγ con y sin tratamiento en cultivos de monocapa y esfera de HeLa. Se midió la expresión de los genes PTEN, E6 y E7 en cultivos de monocapa y esfera de HeLa. Se realizaron ensayos *in vivo* inyectando cervoesferas tratadas y no tratadas con I₂ en ratones NOD/SCID. Las fotos son imágenes representativas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular en monocapa

Las líneas celulares humanas derivadas de cáncer cervicouterino HeLa (ATCC@-CRM-CCL-2 T, adenocarcinoma, HPV-18) y SiHa (ATCC@-HTB-35, carcinoma de células escamosas, HPV-16), se obtuvieron de ATCC (Colección Americana de Cultivos, Manassas, VA, USA). Se sembraron células de cultivo en monocapa (500.000 células) en placas de cultivo celular de 100 mm (Corning, Inc., Corning, NY, EE. UU.) en 7 ml de medio, se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en medio DMEM (Gibco®) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco®) y 100 U/mL de penicilina / estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.).

Cultivo celular en esferas

Para la formación de cervoesferas derivadas de las líneas celulares HeLa y SiHa, los cultivos celulares en monocapa se cultivaron hasta un 70-80% de confluencia y luego se cosecharon, se contaron y se lavaron con solución tampón de fosfato (PBS) para eliminar el resto de suero fetal bovino (SFB). Después de eso, las células se cultivaron en medio DMEM F12 (Gibco®) suplementado con un factor de crecimiento epidermal a una concentración de 20 ng/mL (BioLegend Inc., San Diego, CA, EE. UU.), un factor de crecimiento básico de fibroblastos a una concentración de 20 ng/mL (BioLegend Inc., San Diego, CA, EE. UU.), 10 µl/mL de B27 (50X, Gibco®) y 100 U/mL de penicilina/estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), a una densidad de 3x10³ células/ml en platos de ultra baja adherencia de 100 mm (Corning, Inc., Corning, NY, EE. UU.). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 3 días y la formación de las cervoesferas se controló diariamente.

Viabilidad celular

5000 células por pozo fueron sembradas en una placa de 96 pozos y se incubaron por 24 h a 37° C, en una atmósfera al 5% de CO₂ (aproximadamente 70% de confluencia). Luego se realizaron los tratamiento con I₂ por 24 h y al término del

tiempo se realizaron los ensayos de viabilidad utilizando el kit de viabilidad OZBLUE (OZ Biosciences, San Diego, USA). Después de 24 h de incubación con I₂, se adicionó directamente a los pozos un volumen del colorante correspondiente al 10% del total del medio de cultivo en cada pozo. Luego se incubó por 2 horas y media a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ para posteriormente leer la absorbancia en una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro. La señal fluorescente/colorimétrica emitida es directamente proporcional al número de células vivas.

Tratamientos de yodo molecular

El I₂ se diluyó previamente en medio de cultivo y luego se agregó a las células. Después de realizar una curva-dosis respuesta, los cultivos de monocapas y esferas de las líneas celulares SiHa y HeLa se trataron a una concentración de 200 µM de I₂ durante 24 h. Los cultivos de esfera y monocapa fueron tratadas a los dos días de crecimiento, luego de las 24 h con I₂, los cultivos fueron recolectados y procesados para las pruebas correspondientes.

Western Blot

Las proteínas totales de la monocapa de HeLa (confluencia 70–80%) y las cervoesferas tratadas o no tratadas con 200 µM de I₂ durante 24 h se extrajeron con tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% desoxicolato, 0,1% sodio dodecil sulfato [SDS] y Tris HCl 50 mM, pH 8,0) complementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasa sin EDTA (Roche, EE. UU.) e incubado en hielo durante 20 min. Las concentraciones de proteína se midieron utilizando el método de Bradford (Bio-Rad, EE. UU.). Las muestras que contenían 70 mg de proteína se hirvieron en SDS que contenía una muestra tampón (SDS al 10%, glicerol al 20%, Tris-Cl 20 mM, pH 6,8, β-mercaptoetanol 10 mM y azul de bromofenol al 0,05%), separadas por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBS que contenía Tween-20 al 0,1% durante 1 hora y se incubaron con la dilución de anticuerpo apropiada. El anticuerpo PPARγ

(sc-7196, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.) se utilizó a una dilución de 1:1000 y el anticuerpo GAPDH (sc-48167, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.) se usó a una dilución de 1:10000. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 12 h a 4°C en agitación suave.

Al término de la incubación, se realizaron tres lavados con TBS/Tween-20 (Tris HCl 10mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween al 0.05%). Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos en agitación moderada.

Al término de los lavados, las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP a una dilución de 1:10000 anti-conejo (sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.) y el anticabra (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.) se usó a una dilución de 1:20000. La incubación con los anticuerpos secundarios fue de 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Al término de la incubación, se realizaron dos lavados con TBS/Tween 20 y un lavado con TBS 1X. Cada lavado fue de 10 min en agitación moderada.

Las proteínas se visualizaron a través de una reacción de quimioluminiscencia utilizando el sustrato quimioluminiscente Super Signals West Pico (Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, EE. UU.). La densitometría se realizó con el software ImageJ (versión 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) y la quimioluminiscencia se normalizó a nivel de la proteína GAPDH.

Extracción del ARN total, cuantificación del ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La extracción del ARN de las monocapas de HeLa (confluencia 70–80%) y cervoesferas tratadas o no tratadas con 200 μ M de I₂ durante 24 h se realizó utilizando Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596026), el ARN extraído se trató con DNaseI (ThermoFisher Cat. No. EN0521) y se purificó utilizando el kit Direct-zol TM, RNA MicroPrep (Zymo Research, Cat. No. R2060). El ARN purificado se cuantificó utilizando un sistema de espectrofotometría Epoch TM y se sometió a retro-transcripción con 2000 ng de ARN con el sistema de síntesis de primera

hebra SuperScript™ IV (Invitrogen, n.º de cat. 18091050) para obtener un ADNc. Mediante PCR en tiempo real, se evaluó el cDNA para determinar los niveles de expresión de PPAR γ (F-PPAR γ : TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC y R-PPAR γ : GCA TTA TGA GAC ATC CCC AC), PTEN (F -PTEN: GAT GAG GCA TTA TCC TGT ACA CA y R-PTEN: CTC TTC AGA TAC TCT TGT GCT GT) E6 (F-E6: GCG ACC CTA CAA GCT ACC TG y R-E6: GTT GGA GTC GTT CCT GTC GT) y los genes E7 (F-E7: TGA AAT TCC GGT TGA CCT TC y R-E7: CAC GGA CAC ACA AAG GAC AG). Se usaron los oligo-nucleótidos para el gen GAPDH (F-GAPDH: AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT G y R-GAPDH: CCA TGG GTG GAA TCA TAT TGG AA) como control. Se colocaron 100 ng de cDNA, 12.5 μ L de la mezcla maestra Maxima SYBR y 10 pmol de cada oligonucleótido en un volumen total de 25 μ L y se llevó a cabo la PCR en tiempo real. Las condiciones de reacción fueron 95°C durante 10 min para la desnaturalización inicial, 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s para la desnaturalización, alineación y extensión, respectivamente. La reacción se realizó en el equipo QIA-GEN Rotor-Gene Q. Los niveles de expresión de los ARNm se determinaron a partir del ciclo umbral (Ct), y los niveles de expresión relativos se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para la cuantificación de ARNm, los valores de Ct se normalizaron a la expresión del nivel del ARNm de GAPDH.

Análisis de marcadores por citometría de flujo

Las monocapas y las cervoesferas tratadas o no tratadas con 200 μ M de I₂ durante 24 h se recogieron por separado y se colocaron en tubos donde permanecieron durante 15 min. Después de ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y las células del fondo se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 500 g (r=11 cm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón de flujo (PBS 1X, BSA al 0,05%) y se disgregaron mediante pipeteo mecánico. Antes de la incubación con los anticuerpos anti-CK17, anti-OCT-4, anti-SOX2, anti-NANOG y anti-KLF4, las células fueron permeabilizadas mediante incubación con metanol durante 15 minutos en hielo. Luego, las células se lavaron y se incubaron con los anticuerpos

primarios correspondientes. Para cada anticuerpo primario, se incubaron 5×10^5 células con anti-CD49f-PE (Clona GoH3: 555736, BD Bioscience, CA, EE. UU.), anti-CK17 Clona:(Q-09) sc-100930, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE. UU.), Anti-OCT-4-AlexaFluor488 Clona:3A2A20, anti-SOX2-AlexaFluor488 Clona: 14A6A34 (ambos BioLegend Inc., San Diego, CA, EE. UU.), Anti-NANOG-PE (Clona:N31-355 BD Bioscience, CA, EE. UU.), anti-KLF4-APC (Clona:IC3640A R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) durante 30 minutos en hielo. Después de ese tiempo, las células se lavaron con 300 μ l de tampón de flujo y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células incubadas para anti-CK17, después del tiempo transcurrido, se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a FITC durante 30 minutos en hielo. Al final de la incubación, las células se lavaron nuevamente con tampón de flujo, se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Todas las células se lavaron y se fijaron con P-formaldehído al 4% en PBS 1X. Cada marcador también se incubó con controles de isotipo en las mismas condiciones de los anticuerpos primarios. Las células teñidas se leyeron en el equipo ATTUNE NXT (Thermo Fisher Scientific Inc). Se registraron al menos diez mil eventos para cada medición. El software FlowJo® fue utilizado para el análisis de los datos.

Ensayos tumorigénicos *in vivo*

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Cancerología [Prot. No. 018/012/IBI) (CEI/1096/17), de fecha 03.02.2018].

Ratones hembras NOD/SCID (Diabéticos no obesos/Inmunodeficiencia combinada grave), fueron usados para probar la capacidad tumorigénica de las cervoesferas tratadas y no tratadas con I_2 . Los animales tenían entre 4 y 6 semanas de edad, pesaban entre 21 y 25 gramos y se obtuvieron de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Después de la aclimatación en el bioterio del Instituto Nacional de Cancerología, fueron designados aleatoriamente para los grupos experimentales. Los ratones fueron xenotransplantados por vía subcutánea con células de monocapa de HeLa y

células de las cervoesferas de HeLa tratadas y no tratadas con 200 μM de I_2 durante 24 h en diferentes cantidades utilizando seis ratones por grupo. A lo largo del experimento, los ratones vivieron en una habitación con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h, a una temperatura de 27 ° C, 60% de humedad relativa y tuvieron acceso libre a comida y agua. Los ratones fueron monitoreados durante al menos 2 meses. El manejo y la ejecución de los procedimientos experimentales en ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices locales e internacionales, como la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio), el código de ética de IIB–UNAM y otras directrices internacionales. Para los tumores subcutáneos en ratones, el tamaño máximo permitido es de 2 cm de diámetro. El crecimiento del tumor se controló tres veces a la semana durante 8 semanas. Al final de las 8 semanas, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO_2 comprimido. Después de eso, los tumores se extrajeron a través de un corte hecho en la piel y se midieron, se pesaron y se documentaron por foto. Cada tumor se midió con una regla de vernier y el volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula de Attia-Weiss "Volumen del tumor = (0.4) (a) (b²)", donde "a" es el diámetro más grande y "b" el diámetro más pequeño de cada tumor.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism (v 6.0; GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Se realizó ANOVA de una o dos vías para determinar la importancia de las diferencias entre los grupos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (DE), y los valores con $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

El I₂ interfiere con la viabilidad de los cultivos en monocapa pero no lo hace en la esfera de las líneas celulares HeLa y SiHa y en la formación de cervoesferas.

Se llevó a cabo una curva dosis-respuesta (100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) de I₂ durante 24 horas para evaluar la viabilidad celular en condiciones de cultivo adherente (monocapa) de células HeLa y SiHa (Fig. 10A). Las concentraciones utilizadas anteriormente, fueron tomadas en referencia a estudios realizados en otras líneas celulares derivadas de cáncer (Arroyo-Helguera O 2006; Langer R 2003; Nava-Villalba 2014; Nuñez-Anita RE 2009; Rosner H 2009). Las células HeLa fueron ligeramente más resistentes que SiHa a 100 μ M de I₂ y el efecto antiproliferativo de I₂ mostró una dosis-respuesta sostenida en ambos tipos de células. Para evaluar un posible efecto de I₂ en las células CTCs, dado que a una concentración de 400 μ M de I₂ mostraron una alta citotoxicidad, se seleccionó la concentración de 200 μ M de I₂ para los siguientes experimentos. Un suplemento de 200 μ M de I₂ por 24 horas, interfirió con la formación de las cervoesferas de HeLa, observándose que las tratadas eran más pequeñas, con conformación irregular en comparación con las cervoesferas no tratadas (Fig. 10B), sin embargo, la viabilidad celular no se vio afectada (Fig. 10C).

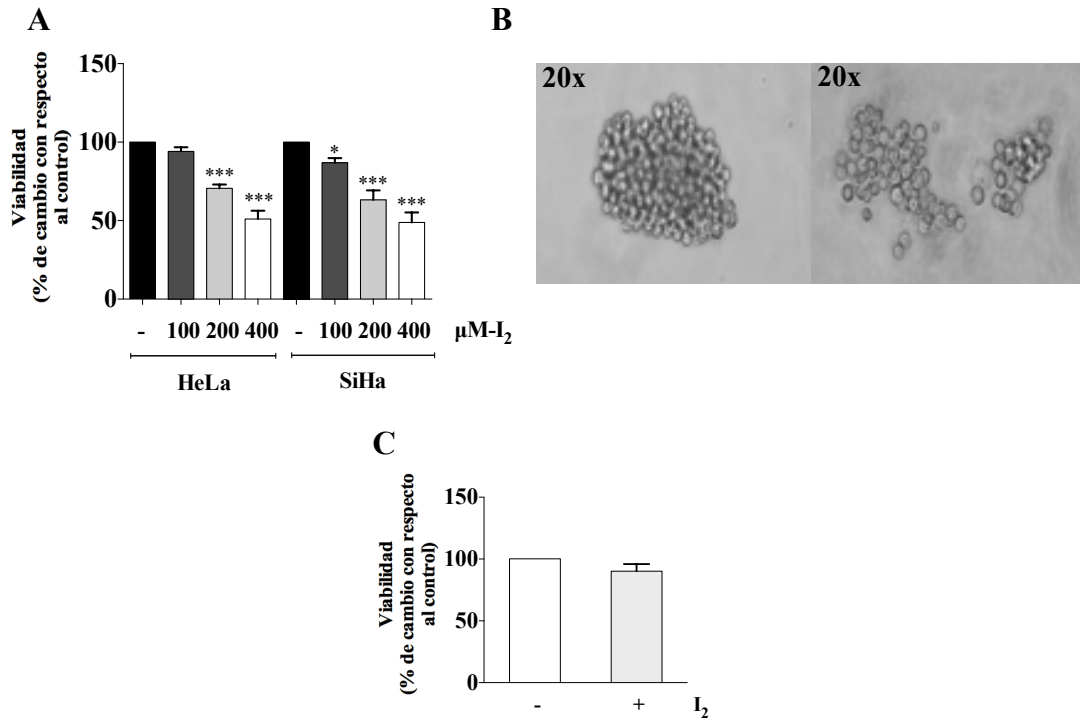


Figura 10.- Efecto de I₂ sobre las células HeLa y SiHa e inhibición de la formación de las cervoesferas de HeLa. (A) Ensayo de viabilidad de cultivos en monocapa de células HeLa y SiHa de 72 horas tratadas con 100, 200 y 400 μM (I₂) y agua desionizada (control) durante 24 horas. **(B)** Cervoesferas de HeLa sin tratamiento (izquierda) y tratadas con 200 μM (I₂) durante 24 horas (derecha). **(C)** Ensayo de viabilidad de cervoesferas de HeLa sin tratamiento y tratadas con 200 μM (I₂) durante 24 horas. Los datos se expresan como media ± DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de una vía y las diferencias entre medias fueron evaluados con una prueba post-hoc. (Dunnett). El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (* P <0,05, *** P <0,001).

La expresión de CD49f en las cervoesferas de HeLa y los cultivos en monocapa y cervoesferas de SiHa son inhibidas por el I₂.

La proteína CD49f se evaluó en condiciones no adherentes (cervoesferas) durante 7 días (datos no mostrados). Al tercer día, se encontró el nivel de expresión más alto de la proteína CD49f, lo que nos podía sugerir una mayor proporción de células con características de troncalidad. La monocapa y las cervoesferas fueron tratadas al segundo día con 200 µM de I₂ o agua desionizada (control) durante 24 horas y posteriormente analizadas. El I₂ fue eficaz en reducir la expresión de CD49f en las cervoesferas de HeLa y SiHa y sus respectivas monocapas aunque como la expresión de CD49f en la monocapa de HeLa fue muy baja, los tratamientos con yodo molecular disminuyeron su expresión pero no a niveles significativos (Fig. 11).

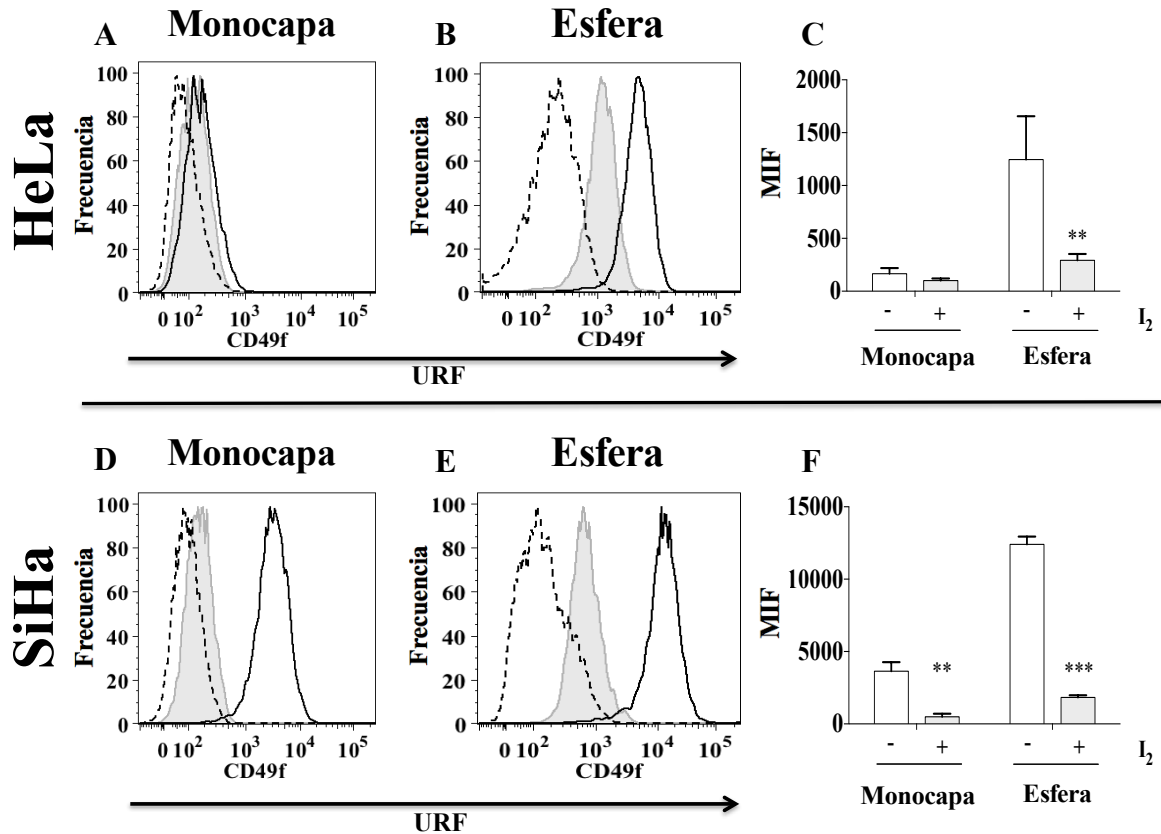


Figura 11. CD49f se reduce por los tratamiento con I₂ en monocapas y esferas de HeLa y SiHa. Los cultivos en monocapas de células HeLa y SiHa se trataron con 200 µM (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (línea entrecortada) (**A y D**). Los cultivos en esferas de células HeLa y SiHa se trataron con 200 µM de (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (línea entrecortada) (**B y E**). CD49f se analizó mediante citometría de flujo (**A, B, D, E**). Los datos se expresan como media ± DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de dos vías. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (** P < 0,01, *** P < 0,001) (**C y F**).

El I₂ reduce significativamente la expresión de CK17 en cultivos de monocapa y cervoesfera de HeLa y SiHa.

CK17 es un marcador esencial para la identificación CTCC. Al igual que el ensayo anterior, las cervoesferas de HeLa y SiHa y las células en monocapa se trataron el segundo día con 200 µM de I₂ o agua desionizada (control) durante 24 horas. El análisis de citometría, mostró que I₂ era capaz de disminuir los niveles de la proteína CK17 en las células HeLa y SiHa en condiciones de monocapa y cervoesfera (Fig. 12).

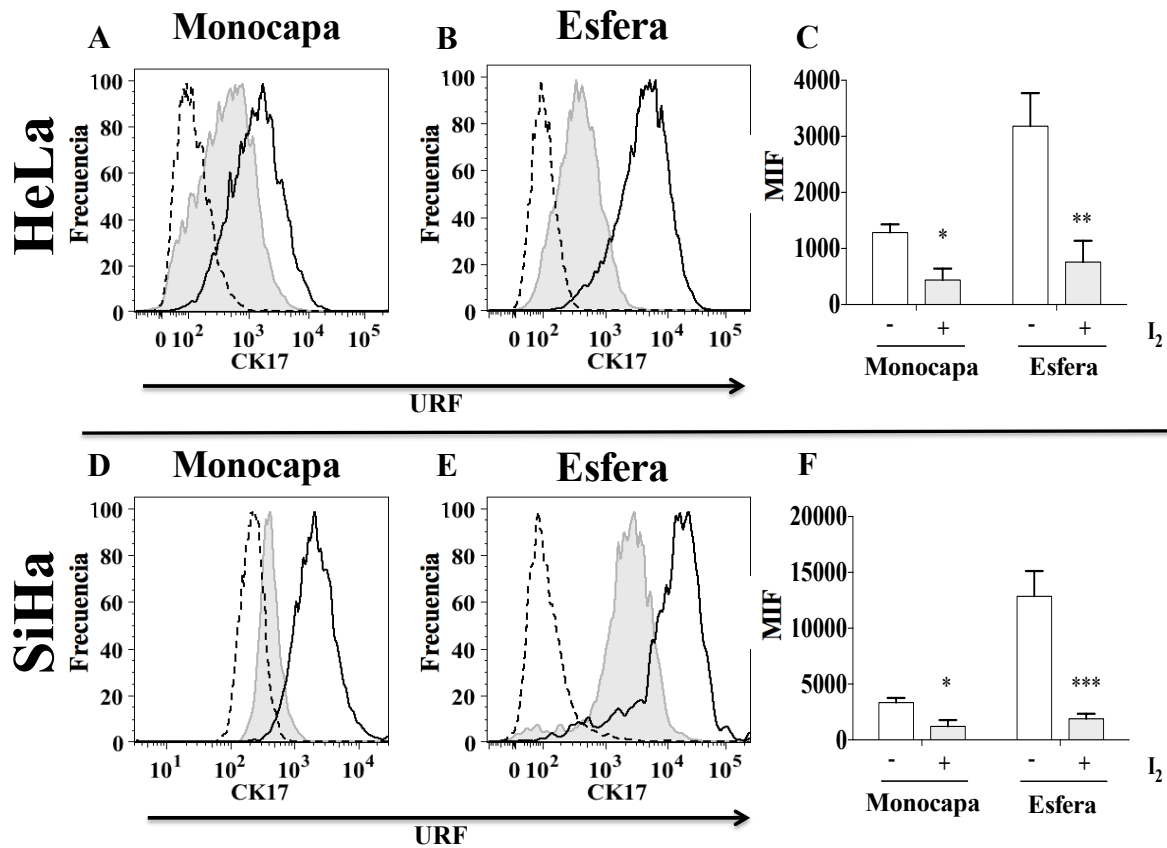


Figura 12. CK17 se reduce mediante tratamiento con I₂ en monocapas y esferas de HeLa y SiHa. Los cultivos de monocapas de células HeLa y SiHa se trataron con 200 µM (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (línea entrecortada) (**A y D**). Los cultivos en esferas de células HeLa y SiHa se trataron con 200 µM (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (línea entrecortada) (**B y E**). CK17 se analizó mediante citometría de flujo (**A, B, D, E**). Los datos se expresan como media ± DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de dos vías. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control [* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 (**C y F**)].

Los marcadores de troncalidad OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG se reducen significativamente con el tratamiento de I₂ solo en las cervoesferas HeLa y SiHa.

La identificación de marcadores de troncalidad tales como OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG fueron necesarios para evaluar la troncalidad de nuestras cervoesferas. Analizamos estos factores de transcripción en células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y cervoesfera en presencia o ausencia de I₂. Como era de esperarse, encontramos más expresión de las proteínas en las cervoesferas en comparación con las células cultivadas en monocapa. De manera interesante, los marcadores OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG disminuyeron con los tratamientos de I₂ tanto en cultivos de cervoesfera como en monocapa de células HeLa (figura 13) y SiHa (figura 14).

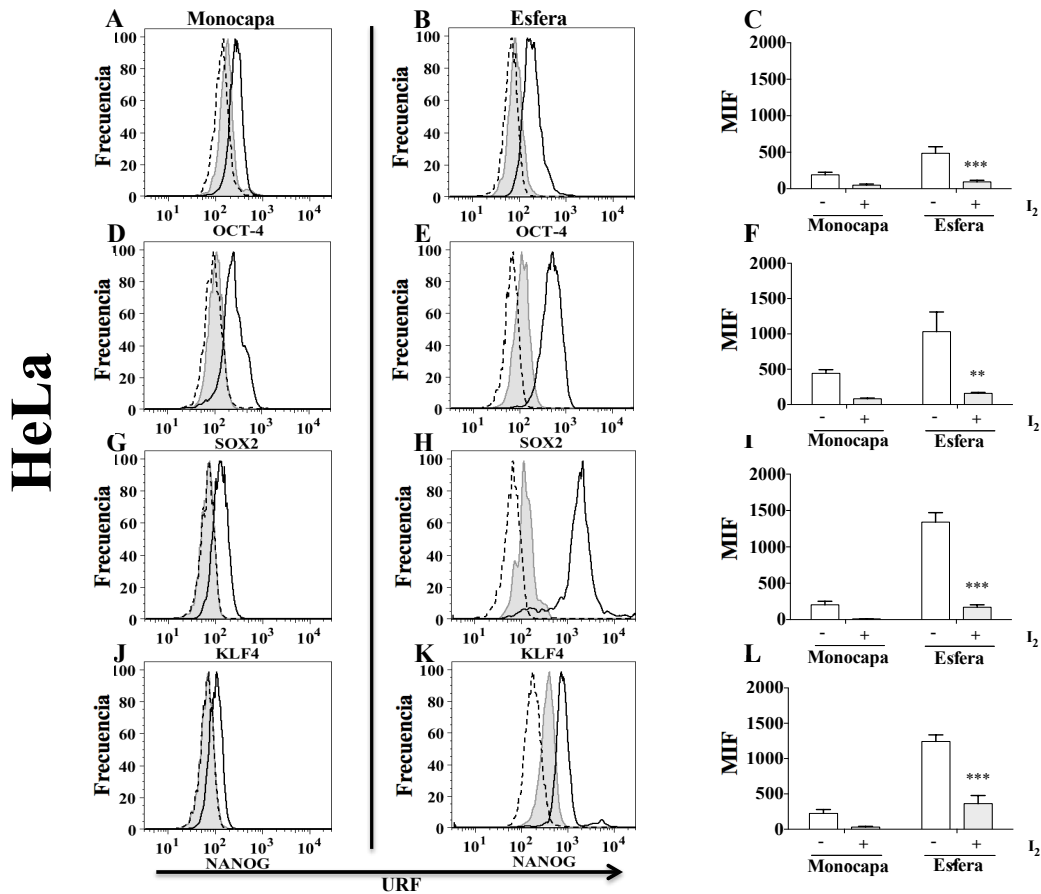


Figura 13. El tratamiento con I_2 solo reduce significativamente OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG en células HeLa cultivadas como esferas. Los cultivos en monocapas de células HeLa se trataron con 200 μ M (I_2) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (línea entrecortada) (**A, D, G, J**). Los cultivos de esferas de células HeLa se trataron con 200 μ M (I_2) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (líneas entrecortadas) (**B, E, H, K**). Los marcadores se analizaron mediante citometría de flujo (**A, B, D, E, G, H, J, K**). Los datos se expresan como media \pm DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de dos vías. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (** P <0,01, *** P <0,001) (**C, F, I, L**).

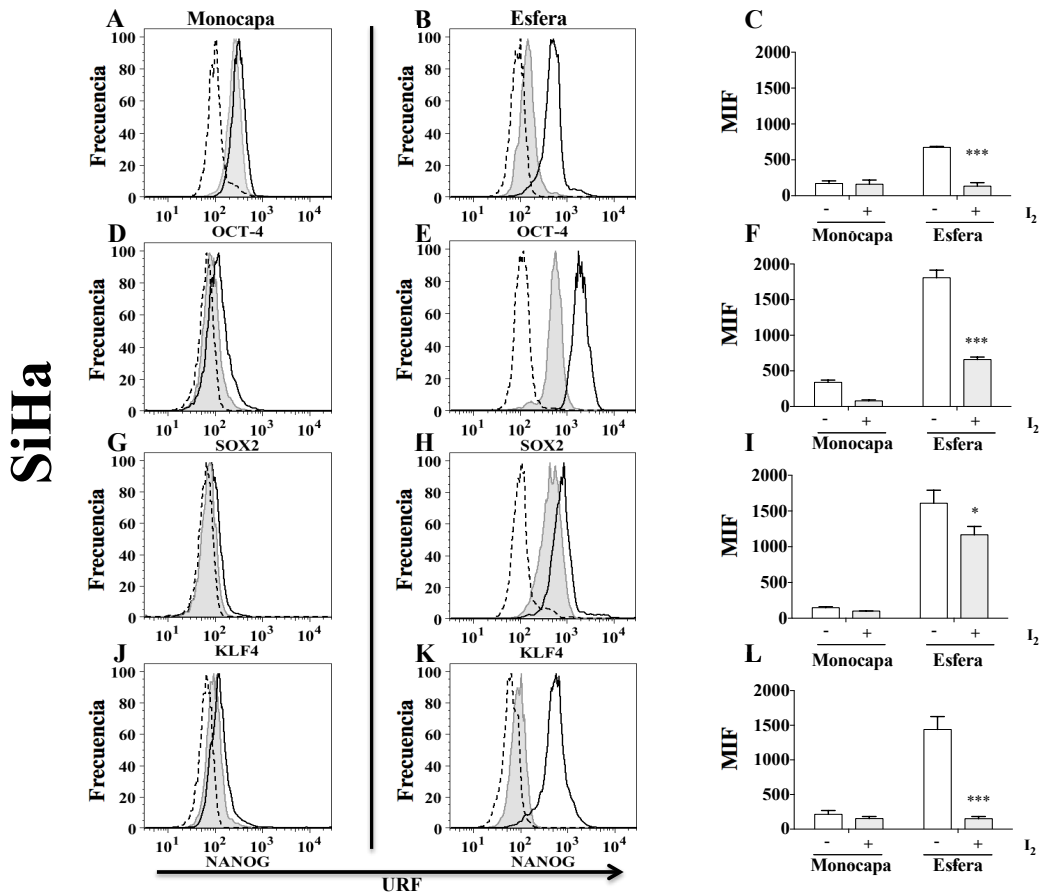


Figura 14. El tratamiento con I₂ solo reduce significativamente OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG en células SiHa cultivadas como esferas. Los cultivos en monocapas de células SiHa se trataron con 200 μ M (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (líneas entrecortadas) (**A, D, G, J**). Los cultivos de esferas de células de SiHa se trataron con 200 μ M (I₂) durante 24 horas (línea gris), sin tratamiento (línea negra), isotipo (líneas entrecortadas) (**B, E, H, K**). Los marcadores se analizaron mediante citometría de flujo (**A, B, D, E, G, H, J, K**). Los datos se expresan como media \pm DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de dos vías. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (* P <0,05, *** P <0,001) (**C, F, I, L**).

La activación de PPAR gamma está regulada con los tratamientos de I₂ en células HeLa.

Se ha propuesto que el efecto antineoplásico del yodo molecular está mediado por la activación de los receptores PPAR γ por la 6-yodolactona, lo que a su vez causa un aumento en estos receptores después del tratamiento. La monocapa y las cervoesfera de células HeLa se incubaron con 200 μ M de I₂ durante 24 horas dando como resultado un aumento significativo en las proteínas PPAR gamma en comparación con sus contrapartidas no tratadas (Fig. 15A-B). Para corroborar la activación de PPAR γ , se analizó la expresión de PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma diez), un gen conocido que es regulado por PPAR γ . La Fig. 15C muestra que las células HeLa suplementadas con I₂ exhiben un aumento significativo de la expresión del gen PTEN tanto en monocapa como en cervoesfera. Este resultado indica que el mecanismo de los efectos antineoplásicos del yodo molecular podría ser a través de PPAR γ . La Fig. 15 D-E muestra el efecto de I₂ sobre la expresión de los oncogenes de HPV18 E6 y E7, dando como resultado una reducción de la expresión de E6 y E7 en células cultivadas en monocapa y ningún efecto en la cervoesfera tratadas con I₂. Sólo en este análisis, si se comparó la expresión de los oncogenes entre monocapa y esfera debido a su relación en la autorrenovación en CTCs como se reporta en la literatura (Tyagi A 2016).

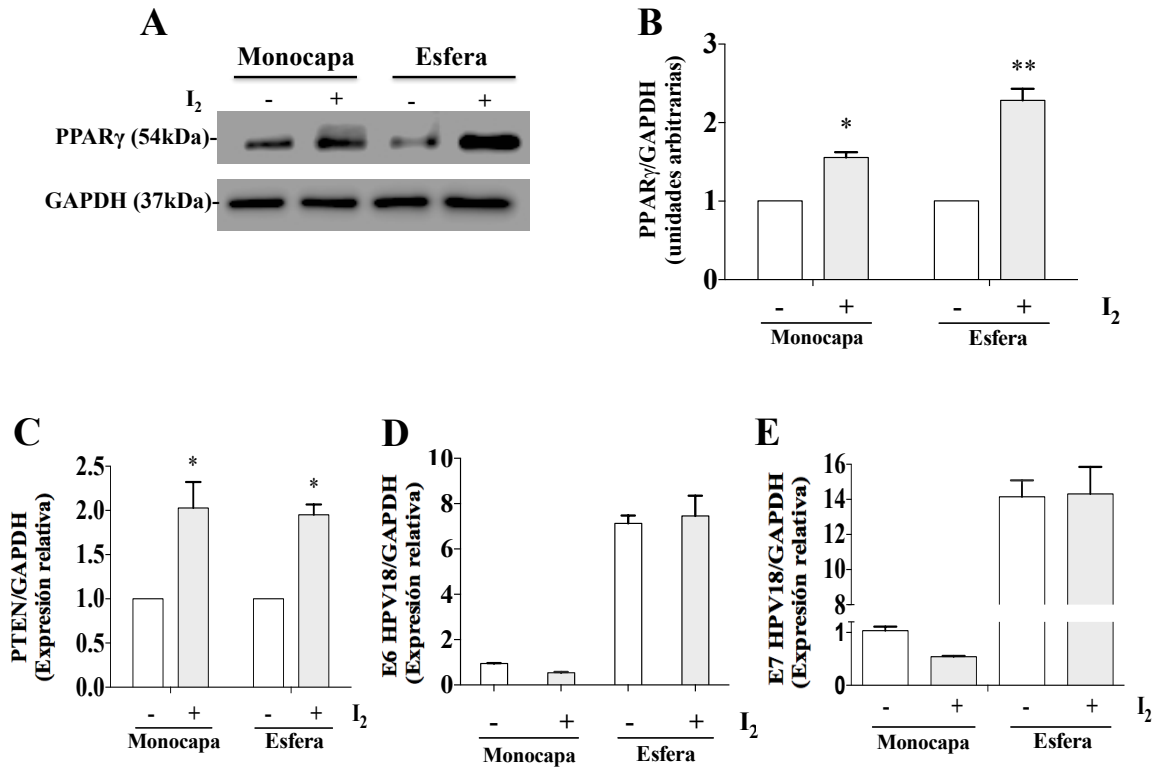
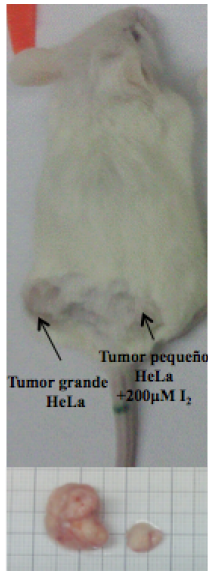


Figura 15. PPAR γ y PTEN aumentan en las células HeLa con tratamiento de I₂. Los cultivos en monocapas y esferas de células HeLa se trataron con 200 μ M (I₂) durante 24 horas y la proteína PPAR γ se cuantificó mediante Western blot y la densitometría se reportó como el cambio con respecto al control sin tratamiento (**A, B**). La expresión de PTEN se analizó mediante qPCR y se la normalizó a la expresión de GAPDH (**C**). La expresión de las oncoproteínas HPV18 E6 y E7 se analizaron mediante qPCR y se normalizaron a la expresión de GAPDH (**D-E**). Los datos se expresan como media \pm DE (n= 3 ensayos independientes) y los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA de una y dos vías. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control sin tratamiento. (* P <0.05, ** P <0.01).

Los tratamientos con I₂ disminuyen la capacidad de formación de tumores de las cervoesferas de HeLa

Se ha demostrado que la cervoesfera tiene mayor capacidad tumorigénica en comparación con su contraparte en monocapa (**Ortiz-Sánchez E 2016**). En este trabajo, evaluamos el efecto de los tratamientos de I₂ en la capacidad de formación de tumor de la cervoesfera usando un ensayo *in vivo*. Los ratones se inocularon con cervoesferas de HeLa preincubadas durante 24 h con 200 μM de I₂ o agua desionizada (control). Cada animal fue inoculado con ambas poblaciones en el lado izquierdo o derecho, respectivamente (Fig. 16A).

La Fig. 16B-C muestran el número de tumores formados en los ratones como también nos indica que las cervoesferas tratadas con I₂ promovieron tumores más pequeños por lo que, estos resultados nos sugiere un efecto antitumoral del I₂ en estas células altamente tumorigénicas de cáncer cervicouterino caracterizadas por CD49f, CK17 y marcadores de troncalidad. Los tumores comenzaron a crecer a partir de los 17 días después de la inoculación en los ratones y el crecimiento tumoral se evaluó durante 49 días. Observamos que las cervoesferas no tratadas formaron tumores más grandes con un tamaño promedio máximo de 594.9 mm³ en 6/6 ratones, mientras que las cervoesferas tratadas con I₂ formaron tumores mucho más pequeños con un tamaño promedio máximo de 150.8 mm³ de la misma manera en 6/6 ratones (Fig. 16D).

A**B**

Número de tumores			
# Células	Monocapa	Cervoesferas	Cervoesferas tratadas con 200uM de I ₂
1 x 10 ⁵	0 of 3	6 of 6 **	6 of 6 ***
1.5 x 10 ⁶	3 of 3 *	NE	NE

* TV min 400 mm³ y TV max 629 mm³ a 29 días

** TV min 0 mm³ y TV max 594.9 mm³ a 49 días

***TV min 0 mm³ y TV max 290 mm³ a 49 días

NE: No evaluado

TV: volumen tumoral

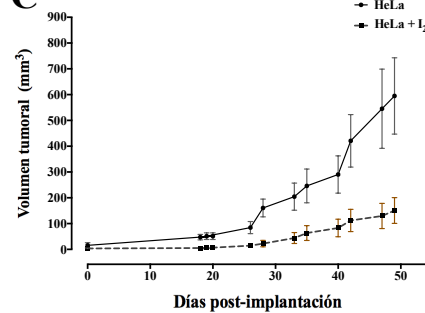
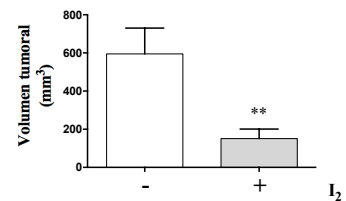
C**D**

Figura 16. Efecto de I₂ en el crecimiento tumoral en ratones NOD/SCID. Las cervoesferas de HeLa se preincubaron con 200 µM de I₂ o agua desionizada durante 24 h. Cada animal fue inoculado con ambas subpoblaciones en cada lado (n = 6) y las flechas indican los sitios de los xenoinjertos **(A)**. Tabla donde indica el número de tumores desarrollados *in vivo* **(B)**. Crecimiento promedio del volumen tumoral a través de los días **(C)**. Media del volumen tumoral de las cervoesferas tratadas y no tratadas con I₂ **(D)**. Los datos se expresan como media ± DE (n= 6 ensayos independientes), y el asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (** P <0,01) **(D)**.

7. DISCUSIÓN

El porcentaje de CTCs es muy bajo en tumores lo que dificulta su estudio (**Bigoni GD 2018**). Se ha demostrado que en cultivos de esferas hay un enriquecimiento en CTCs, por lo que son un buen sistema para evaluar características relacionadas con CTCs de tumores sólidos *in vitro* (**Ishiguro T 2017**). Pero, según **Blagosklonny MV 2017**, este grupo de células debería llamarse esferoides, ya que, poseen una alta capacidad de proliferación, autorrenovación y pueden ser responsables de la reaparición del cáncer después de la terapia. Muchos estudios evalúan la biología de la CTCs y los mecanismos que les otorgan capacidad de quimio-resistencia. Las CTCs muestran resistencia a muchos agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, 5-FU y doxorubicina. Esto se logra a través de su alta expresión de proteínas de supervivencia, eficientes transportadores ABC para expulsar fármacos, vías de señalización que les otorgan propiedades de resistencia y una fosforilación activada mucho mayor de los factores de respuesta al daño del ADN en comparación a la población celular cancerosa (**Noda T 2009; Flahaut M 2009; Gallmeier E 2011; Madjd Z 2009**). Se han utilizado varias estrategias para inhibir todas estas propiedades, pero no han sido suficientes por lo que la resistencia a la quimio-terapia de la CTCs requiere nuevos enfoques dirigidos a eliminar estas células altamente tumorigénicas.

El yodo molecular se ha estudiado en varias líneas celulares de cáncer en el cual muestra su capacidad para inhibir la proliferación, la quimio-resistencia y tener efectos apoptóticos (**Rosner H 2009; Vitale M 2000; Arroyo-Helguera 2008; Nuñez-Anita RE 2009; Nava-Villalba M 2014; Bontempo A 2017**). Sin embargo, no hay estudios sobre su efecto en líneas celulares de cáncer cervicouterino ni en cultivos enriquecidos con CTCs. HeLa y SiHa son las líneas celulares de cáncer cervicouterino más representativas y en este estudio, utilizamos cultivos crecidos en condiciones no adherentes (cervoesferas) donde obtuvimos una mayor proporción de CTCs en comparación con los cultivos tradicionales en monocapa, lo que nos permitió estudiar el efecto del I₂ en CTCs derivadas de líneas celulares de cáncer cervicouterino. Se muestra que el tratamiento con I₂ disminuye la formación de las cervoesferas; además, se observa células vivas y algunas células

mueras en estas esferas; sin embargo, no sabemos si el tratamiento con I₂ induce la muerte en las CTCs.

Como paso siguiente, fue analizar el efecto del I₂ sobre la expresión de los marcadores CD49f y CK17, debido a que nuestro grupo, así como otros autores, propusieron a estos como marcadores putativos para aislar células troncales cancerosas de cáncer cervicouterino (**López J 2012; Ortiz-Sánchez E 2016**).

CD49f se considera un marcador de células troncales tanto normales como cancerosas. Es el único marcador que comparten más de 30 poblaciones de células troncales siendo una de sus características principales el mantenimiento de la autorrenovación (**Krebsbach PH 2017**). También es una proteína crucial para el crecimiento y la supervivencia de una subpoblación de células troncales de mama que muestran una mayor proliferación y una mayor resistencia a los agentes proapoptóticos (**Cariati M 2008**). La importancia de CD49f en el cáncer cervical se ve reforzada por su capacidad de actuar como un co-receptor para la entrada de HPV en las células huésped (**Evander M 1997; McMillan NA 1999**). CK17 es un marcador de la célula diana del VPH (la célula de reserva cervical), que da lugar a la metaplasia y la pérdida de CK17, induce diferenciación celular y disminuye la tumorigénesis en los epitelios cervicales (**Martens JE 2004; Feng D 2009; Regauer S 2007; Hobbs RP 2016**). Observamos que las células tratadas con I₂ muestran una disminución en la expresión de las proteínas CD49f y CK17, moléculas consideradas marcadores de fenotipo CTCs (**Krebsbach PH 2017; Ikeda K 2008**). Dos estudios demostraron que las células con un alta expresión de CD49f, tenían mayor capacidad de formación de tumoresfera, mayor perfil de proliferación celular, mayor capacidad tumorigénica en ensayos *in vivo* en comparación con la población que tenía una expresión baja. También demostraron, que éstas células tenían una expresión elevada de genes conocidos por desempeñar funciones claves tanto en la autorrenovación de células troncales como en la tumorigenicidad de las células cancerosas, sugiriendo a éste, como un marcador de enriquecimiento con células troncales cancerosas en cultivos *in vitro* (**Meyer Mj 2010; Lathia JD 2010**). Por lo tanto, suponemos que la disminución de la expresión de la misma en las células CD49f⁺ causada por I₂, podría tener un

efecto importante en la biología de las CTCs como también en su capacidad tumorigénica. Para validar la capacidad tumorigénica de una línea celular de cáncer humano, se deben realizar xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes; siendo éste, un modelo utilizado para promover el crecimiento tumoral derivado del cáncer humano para el análisis de tumores malignos y la evaluación de fármacos antitumorales **(Engel AM 2006)**. Como el I₂ mostró tener efectos similares sobre las líneas celulares HeLa y SiHa, decidimos utilizar solamente la línea celular HeLa para los experimentos *in vivo*. En los ensayos con los ratones, utilizando cervoesferas tratadas con I₂, observamos que el tratamiento redujo el tamaño del tumor y retrasó su crecimiento. Sin embargo, dado que las células eran aún son viables después del tratamiento, el I₂ podría ayudar a reducir la capacidad tumorigénica junto con el uso de antineoplásicos convencionales como se evidencia en el cáncer de mama **(Alfaro Y 2013; Bontempo 2017)**.

Asimismo, se observó el efecto de I₂ en cultivos de esferas enriquecidos con marcadores de troncalidad como NANOG, SOX2, KLF4 y OCT-4. Se ha demostrado que existe un aumento en la expresión de estos marcadores en los carcinomas cervicales en comparación con el tejido cervical normal y que su sobreexpresión en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino les confiere una mayor capacidad de proliferación, clonogenicidad y tumorigenicidad *in vitro* e *in vivo*, además de promover las características de células troncales **(Mak VC 2012; Liu XF 2014; Li SW 2015; Ding Y 2016)**. Curiosamente, observamos diferentes niveles de expresión de los marcadores de troncalidad entre las cervoesferas de HeLa y SiHa, principalmente en los niveles de proteína de KLF4 y SOX2. Esto indica, que los mecanismos para la autorrenovación podrían depender de diferentes marcadores dependiendo del tipo de célula. Nuestras cervoesferas mostraron una sobreexpresión de estos marcadores de troncalidad en comparación a su contraparte cultivado en monocapa como ya se ha reportado **(López J 2012; Ortiz E 2016)**. Además, el I₂ tuvo la capacidad de disminuir la expresión de los mismos en nuestros cultivos de esfera, lo que apoya el papel del I₂ en la disminución de la capacidad tumorigénica de las cervoesferas ya que como se reporta en la literatura, la disminución de estos marcadores hace que las

células cancerosas sean menos tumorigénicas (**Ben-Porath I 2008; Tai SK 2011; Wang YD 2013; Ding Y 2016**).

El mecanismo propuesto por el cual I₂ disminuye la proliferación celular es a través de la interacción y activación de los receptores PPAR de tipo gamma (**Nava-Villalba M 2014,2015**). En este trabajo, mostramos que las cervoesferas derivadas de las líneas celulares de cáncer cervicouterino tratadas con I₂, incrementaron el nivel de la proteína PPAR γ en comparación con las no tratadas. Como consecuencia, la activación de PPAR γ promueve una mayor expresión de su gen diana la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa [PTEN] (**Teresi RE 2006**) en nuestros cultivos tanto de cervoesfera como en monocapa. Estas observaciones sugieren que el mecanismo por el cual I₂ disminuye los marcadores CD49f, CK17 y de troncalidad en las cervoesferas podría estar mediado por la activación de los receptores PPAR γ y en consecuencia la activación de su gen de respuesta PTEN, involucrado en mecanismos de autorrenovación. Además de disminuir la capacidad de autorrenovación, la activación de PTEN reduce la proliferación celular y la tumorigenicidad en CTCs (**Ciuffreda L 2014**). Sin embargo, se necesitan ensayos adicionales para entender el mecanismo por el cual el I₂ reduce la capacidad de formación de tumores de nuestras cervoesferas. Al trabajar con la línea celular HeLa (derivada de cáncer cervicouterino), se conoce que los genes E6 y E7 del VPH están insertados en el genoma de éstas células. Se demostró que el aumento de la expresión de los genes E6 y E7 está estrechamente relacionado con la troncalidad mediada por HES1, que es un factor de transcripción específico de la vía de señalización NOTCH (**Tyagi A 2016**). En nuestras condiciones también observamos un aumento de la expresión de E6/E7 en las cervoesferas. Interesantemente, el tratamiento con I₂ disminuyó la expresión de E6/E7 en los cultivos en monocapa de HeLa pero no se observó un efecto en los cultivos en esfera por lo que sugiere que el I₂ no tiene ningún efecto sobre la expresión del gen E6/E7 de HPV18 en las cervoesferas.

8.CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran un efecto de inhibición de la formación de cervoesferas mediado por el I₂, asimismo, se observó una menor expresión de las proteínas CD49f, CK17 y marcadores de troncalidad en los ensayos *in vitro*. Éstos resultados estuvieron acompañados con la disminución del tamaño tumoral y la retraso del crecimiento tumoral en los ensayos *in vivo* durante los 49 días que fueron evaluados. A su vez, se observó la activación de PPAR γ al momento de realizar los tratamientos y se sugiere que el efecto antineoplásico del I₂ podría estar relacionado con la activación de éstos receptores. Dado que los suplementos de I₂ se consideran seguros para el tratamiento de enfermedades como la enfermedad fibroquística mamaria humana (**Ghent WR 1993**), el cáncer mamario (**Peralta G 2011**) o la hiperplasia de próstata (**Anguiano B 2010**), sugerimos que el tratamiento del cáncer con I₂ debería estudiarse en ensayos preclínicos para evaluar su potencial además de su efecto solo o en combinación con fármacos terapéuticos convencionales para el tratamiento del cáncer cervicouterino.

9. Bibliografía

- Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P, Hauser K, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Peters J, Friess H, Folkman J and Huber P. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(31):12890–12895.
- Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B, Aceves C. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Molecular Cancer*. 2013;12:45.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8.
- Amin ARMR, Karpowicz PA, Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, Dong JT, Kucuk O, Khan GN, Huang GS, Mi S, Lee HY, Reichrath J, Honoki K, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Helferich B, Boosani CS, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bhakta D, Halicka D, Niccolai E, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X, Bilslund A, Shin DM. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35 Suppl:S55-S77.
- Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4 and Esrrb in bladder, colon and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anatomy&Cell Biology*. 2014;47(1):1-11.
- Anguiano B, Ledezma O, Juarez M, Nuñez F, Aceves C. Therapeutic effect of iodine on benign human prostatic hyperplasia. 14th International Thyroid Congress, Paris, France, September 11–16, 2010; European Thyroid Association, American Thyroid Association, Asia & Oceania Thyroid Association, Latin American Thyroid Society, 2010 [Poster Number P-0051].

- Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13(4):1147-58.
- Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocrine related cancer*. 2008;15(4):1003-11.
- Bajaj J, Zimdahl B, Reya T. Fearful symmetry: subversion of asymmetric division in cancer development and progression. *Cancer Research*. 2015;75(5):792-7.
- Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2012. [Epub ahead of print].
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer?. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;91(1):47-53.
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*. 2008;40(5):499-507.
- Becker JC, Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(7):1137-48.
- Bigoni-Ordoñez GD, Czarnowski D, Parsons T, Madlambayan GJ, Villa-Diaz LG. Integrin $\alpha 6$ (CD49f), the microenvironment and cancer stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2018;[Epub ahead of print].
- Blagosklonny MV. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy. *Cancer Biology & Therapy*. 2007;6:1684-1690.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997;3:730-7.
- Bontempo A, Ugalde-Villanueva B, Delgado-González E, Rodríguez ÁL, Aceves C. Molecular iodine impairs chemoresistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of the CD44+/CD24+ and E-cadherin+/vimentin+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low doses of doxorubicin. *Oncology Reports*. 2017;38(5):2867-2876.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424
- Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, Purushotham AD. Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *International Journal of Cancer*. 2008;122(2):298-304.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S and Smith A. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2003;113:643-655.
- Cann AS, Van Netten PJ, Van NC. Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*. 2000;11(2):121-7.
- Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaja A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;31:16-27.
- Collene RJ, Bigang L, Xin L, Xin C, Can L, Tammy CD, Repass J, Zaehres H, Shen JJ and Tang GD. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*. 2011;30(36):3833-45.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*. 2005;65(23):10946-51.
- Corton JC, Lapinskas PJ, Gonzalez FJ. Central role of PPAR α in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutation Research*. 2000;448(2):139-51.
- D'Abramo CM, Archambault J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *The Open Virology Journal*. 2011;5:80-95.
- Ding Y, Yu AQ, Wang XL, Guo XR, Yuan YH, Li DS. Forced expression of Nanog with mRNA synthesized in vitro to evaluate the malignancy of HeLa cells through acquiring cancer stem cell phenotypes. *Oncology Reports*. 2016;35(5):2643-50.
- De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the

sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2000;80(3):1083-105.

- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.

- Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, Bechter G, Gartner R (1994) Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Hormone and Metabolic Research*. 1994;26(10):465-9.

- Dyson N, Howiey PM, Monger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243:934-7.

- Duan JJ, Qiu W, Xu SL, Wang B, Ye XZ, Ping YF, Zhang X, Bian XW, Yu SC. Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. *Stem Cells and Development*. 2013;22:2221–39.

- Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(15):8806-11.

- Engel AM, Schou M. Assay of tumorigenicity in nude mice. In: Celis JE, Carter NP, Simons K, Small JV, Hunter T, Shotton DM. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Burlington: Eds. Elsevier Academic; 2006. p. 353 – 357

- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(3):504-14.

- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*. 1997;71(3):2449-56.

- Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, Marino M, Martinez-Chantar ML, Nawroth R, Sanchez-Garcia I, Sharma D, Saxena NK, Singh N, Vlachostergios PJ, Guo S, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG,

- Bilsland A, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Bhakta D, Halicka D, Keith WN, Newsheer S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35 Suppl:S25-S54.
- Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports*. 2009;22(5):1129-34.
 - Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, Beckmann JS, Joseph JM, Muhlethaler-Mottet A, Gross N. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene*. 2009;28:2245– 2256.
 - Gallmeier E, Hermann PC, Mueller MT, Machado JG, Ziesch A, De Toni EN, Palagyi A, Eisen C, Ellwart JW, Rivera J. et al. Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the in vitro and in vivo tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133(+) tumor-initiating cell fraction. *Stem Cells*. 2011;29:418–429.36.
 - Ghent WR, Eskin BA, Low DA, Hill LP. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Canadian Journal of Surgery*. 1993;36(5):453-60.
 - Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry Part A*. 2012;81(4):284-93.
 - Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature Medicine*. 2009;15:1010–2.
 - Gu TT, Liu SY, Zheng PS. Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *The American Journal of Pathology*. 2012;181(2):652-61.
 - Hamm JK, el Jack AK, Pilch PF and Farmer SR. Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;892:134-45.
 - Hanahan D and Weinberg A. R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Science*. 2011;144:646-74.

- Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *International Journal of Oncology*. 2013;43(2):425-30.
- Hobbs RP, Batazzi AS, Han MC, Coulombe PA. Loss of Keratin 17 induces tissue-specific cytokine polarization and cellular differentiation in HPV16-driven cervical tumorigenesis in vivo. *Oncogene*. 2016;35(43):5653-5662.
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193-206.
- Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecologic Oncology*. 2008;108(3):598-602.
- Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*. 2017;108(3):283–9.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine*. 2006;355(12):1253-61.
- Kersten S, Seydoux J, Peters J, Gonzalez F, Desvergne B, Wahli W. "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.". *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(11):489–98.
- Khan JM, Castle EP, Lorincz TA, Wacholder S, Sherman M, Scott RD, Rush BB, Glass GA and Schiffman M. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(14):1072-9.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*. 2008;132(6):1049-61.
- Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*. 2017;26(15):1090-1099.

- Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14:275–91.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre JM, Vilter H, Kloareg B. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*. 1998;207(2):163–171.
- Langer R, Burzler C, Bechtner G & Gartner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2003;111(6):325-9.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645–8.
- Lathia DJ, Gallagher J, Heddleston MJ, Wang J, Eyles EC, MacSwords J, Wu Q, Vasanthi A, McLendon ER, Hjelmeland BA and Rich NJ. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(5):421-432.
- Li SW, Wu XL, Dong CL, Xie XY, Wu JF, Zhang X. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118033.
- Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87092.
- López J, Poitevin A, Martínez V, Plasencia C and Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BioMedCentral Cancer*. 2012;12:48
- Lu Y, Futtner C, Rock RJ, Xu X, Whitworth W, Hogan LMB, Onaitis WM. Evidence that SOX2 Overexpression Is Oncogenic in the Lung. *PloS One*. 2010;5(6):e11022.
- Lv X, Wang Y, Song Y, Pang X, Li H. Association between ALDH1+/CD133+ stem-like cells and tumor angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma. *Oncology Letters*. 2016;11(3):1750-1756.
- Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M. CD44⁺ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in

breast tumours. *Cancer Immunity*. 2009;9:4.

- Mak VC, Siu MK, Wong OG, Chan KK, Ngan HY, Cheung AN. Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. *Histology and Histopathology*. 2012;27(9):1121-30.

- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.

- Mansure JJ, Nassim R and Wassim K. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in bladder cancer: A promising therapeutic target. *Cancer Biology & Therapy*. 2009;8(7):6-15.

- Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Research*. 2004;24(2B):771-5.

- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Nicoletti F, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Candido S, Libra M, Bäsecke J, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Milella M, Tafuri A, Cocco L, Evangelisti C, Chiarini F, Martelli AM. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*. 2012;3(9):954-87.

- McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999;261(2):271-9.

- Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Research*. 2010;70(11):4624-33.

- Michalik L, Desvergne and Wahli W. Peroxisome-proliferator- activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(1):61-70.

- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M and Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*.

2003;113(5):631-42.

- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial- mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008;3(8): e2888.

- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):518-27.

- Nava-Villalba M, Aceves C. 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2014;112:27–33

- Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Dono K. et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2009;100:1647–1658.

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23–8.

- Nuñez Anita RE, Cajero Juárez M, Aceves C. Peroxisome proliferator-activated receptors. Role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2011;11(7):775-86.

- Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2009;89(1-2):34-42.

- O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Seminars in radiation oncology*. 2009;19(2):71-7.

- Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñiz-Hernández S, Garrido E, Cantú De León D, García-Carrancá A. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*.

2016;7(22):31943-54.

- Peralta G, Torres J, Delgado G, Dominguez A, De Obaldia R, Duarte L, Paredes E, Avecilla C, Hernández S, Vega-Riveroll L and Aceves C. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: anti-neoplastic synergy and cardioprotector. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida, April 2–6, 2011; American Association for Cancer Research: Philadelphia, PA, 2011 [Poster Number 3509/16].
- Petricciani JC, Wallace RE, McCoy DW. A comparison of three in vivo assays for cell tumorigenicity. *Cancer Research*. 1974;34(1):105-8.
- Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular Biology of the Cell*. 2016;27(21):3233-3244.
- Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2012;44(1):127–139.
- Pinheiro C, Garcia EA, Morais-Santos F, Moreira MA, Almeida FM, Jubé LF, Queiroz GS, Paula ÉC, Andreoli MA, Villa LL, Longatto-Filho A, Baltazar F. Reprogramming energy metabolism and inducing angiogenesis: co-expression of monocarboxylate transporters with VEGF family members in cervical adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2015;15:835.
- Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, Bocanera LV, Pregliasco LB, Sartorio G, Chester HA. Studies on the goiter inhibiting action of iodolactones. *European Journal of Pharmacology*. 1994;258(1-2):33-7.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*. 2005;65(13):5506-11.
- Regauer S and Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high- grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 2007;50(5):629-35.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*.

2007;445(7123):111-5.

- Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Transportador de yodo (NIS) y su aplicación diagnóstica y terapéutica en diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*. 2008;55(3):107–110.

- Rillema JA, Mulder JA. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins and Medicine*. 1978;1(1):31-8.

- Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1980;64(5):1061-70.

- Rosner H, Torremante P, Moller W, Gartner R. Antiproliferative/Cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2009;118(7):410-9.

- Rycaj K, Tang DG. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Research*. 2015;75(19):4003-11.

- Saeg F, Anbalagan M. Breast cancer stem cells and the challenges of eradication: a review of novel therapies. *Stem Cell Investigation*. 2018;5:39.

- Samadi AK, Bilisland A, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Bishayee A, Azmi AS, Lokeshwar BL, Grue B, Panis C, Boosani CS, Poudyal D, Stafforini DM, Bhakta D, Niccolai E, Guha G, Vasantha Rupasinghe HP, Fujii H, Honoki K, Mehta K, Aquilano K, Lowe L, Hofseth LJ, Ricciardiello L, Ciriolo MR, Singh N, Whelan RL, Chaturvedi R, Ashraf SS, Shantha Kumara HMC, Nowsheen S, Mohammed SI, Keith WN, Helferich WG, Yang X. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35 Suppl:S151-S184.

- Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):15-30.

- Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S, Chang S, Lau P, Fowler AJ, Chuang G, Moser AH, Brown BE, Mao-Qiang M, Uchida Y, Schoonjans K, Auwerx J, Chambon P, Willson TM, Elias PM, Feingold KR. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid

accumulation in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(4):971-83.

- Schulenburg A, Blatt K, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I, Herrmann H, Marian B, Grunt TW, Zielinski CC, Valent P. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application? *Journal of Hematology & Oncology*. 2015;8:16.

- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y, Kishimoto T, Sano H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *The Prostate*. 2002;51(2):108-16.

- Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69-80.

- Singh KS, Clarke DI, Terasaki M, Bonn EV, Hawkins C, Squire J and Dirks BP. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research*. 2003; 63:5821-5828

- Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Link M, Lane B, Leigh I, Schijf C, Vooijs P. Keratin expression in cervical cancer. *American Journal of Pathology*. 1992;141(2):497-511.

- Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene*. 1997;14:1013–21.

- Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, Horn S, Bäsecke J, Cervello M, Nicoletti F, Libra M, Stivala F, Martelli AM, McCubrey JA. Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2008;12(9):1139-65.

- Stewart CC. Multiparameter flow cytometry. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2000;21(2-3):255-72.

- Stiehl T and Marciniak-Czochra A. Stem cell self-renewal in regeneration and cancer: Insights from mathematical modeling. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017;5:112–120.

- Tagscherer KE, Fassel A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC, Macher-Goeppinger S, Radlwimmer B, Wiestler OD, Herold-Mende C, Roth W. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 2008;27(52):6646-56.
- Tai SK, Yang MH, Chang SY, Chang YC, Li WY, Tsai TL, Wang YF, Chu PY, Hsieh SL. Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*. 2011;102(4):895–902.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72
- Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126,663–676.
- Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA, Eng C. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone. *International Journal of Cancer*. 2006;118(10):2390-8.
- Toledo-Guzmán ME, Bigoni-Ordóñez GD, Ibáñez Hernández M, Ortiz-Sánchez E. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World Journal of Stem Cells*. 2018;10(12):183-195.
- Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 2015;347(6217):78–81.
- Tyagi A, Vishnoi K, Mahata S, Verma G, Srivastava Y, Masaldan S, Roy BG, Bharti AC, Das BC. Cervical Cancer Stem Cells Selectively Overexpress HPV Oncoprotein E6 that Controls Stemness and Self-Renewal through Upregulation of HES1. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(16):4170-84.
- Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E, Rossi G. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53 independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*. 2000;141(2):598-605.

- Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL and Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death and Disease*. 2013;4:e760.
- Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The European Molecular Biology Organization journal*. 2002;21(15):3919-3926
- Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 2004;72(8):387-95.
- Wicha MS, Liotta LA, Kidwell WR. Effects of free fatty acids on the growth of normal and neoplastic rat mammary epithelial cells. *Cancer Research*. 1979;39(2Pt 1):426-35.
- Yang P, Cartwright CA, Li J, Wen S, Prokhorova IN, Shureiqi I, Troncso P, Navone NM, Newman RA, Kim J. Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *International Journal of Oncology*. 2012;41(4):1495-503.
- Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. 2014;5.
- Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991;184:9-13

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Molecular iodine inhibits the expression of stemness markers on cancer stem-like cells of established cell lines derived from cervical cancer

Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez^{1,2}, Elizabeth Ortiz-Sánchez¹, Pedro Rosendo-Chalma^{1,3}, Heriberto A Valencia-González^{1,2}, Carmen Aceves^{4*} and Alejandro García-Carranca^{1,5*} 

Abstract

Background: Cancer stem cells (CSC) are characterized by deregulated self-renewal, tumorigenicity, metastatic potential, aberrant stemness signaling pathways, resistance to conventional therapy, and the ability to give rise to a progeny of proliferating cells that constitute the bulk of tumors. Targeting CSC will provide novel treatments for cancer. Different investigations have focused on developing complementary approaches that involve natural compounds that decrease chemo-resistance and reduce the side effects of conventional therapies. Since, it has been reported that molecular iodine (I₂) exhibits antineoplastic effects and decreases tumor progression in some cancer models, we evaluated the potential effect of I₂ on cell cultures enriched in cervical cancer stem-like cells.

Methods: HeLa and SiHa cervical cancer cells were treated with 200μM I₂ for 24 h. After time, cells were cultured in CSC-conditioned medium (cervospheres) and viability assays were performed. Following, tumorigenic capabilities in cervospheres treated with I₂ were evaluated in NOD/SCID mice. HeLa monolayer cells untreated and their respective cervosphere cells treated or untreated with 200 μM of I₂ for 24 h were xenotransplanted subcutaneously at different amounts and mice were monitored for at least 2 months.

Results: In the present study, monolayer and CSC-enriched cultures (cervospheres) from cervical cancer-derived cell lines, HeLa and SiHa, showed that 200μM I₂ supplementation inhibits proliferation of both and decreased their tumorigenic capacity, in vivo. This antineoplastic effect of I₂ was accompanied by diminished expression of stemness markers including CD49f, CK17, OCT-4, NANOG, SOX2, and KLF4, as well as increased expression and activation of PPARγ receptors.

Conclusions: All this data led us to suggest a clinical potential use of I₂ for targeting CSC and improve current treatments against cervical cancer.

Keywords: Molecular iodine, Cervical cancer stem cells, Stemness markers, PPAR gamma

* Correspondence: caracev@unam.mx; carranca@biomedicas.unam.mx

⁴Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Campus-Juriquilla, Querétaro 76230, Qro, Mexico

¹División de Investigación Básica, Laboratory of Virus and Cancer, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Av. San Fernando No. 22, Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CP, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

In 2012, cancer caused 8.2 million deaths with 14.1 million new cases with a higher prevalence in men than in women. Cervical cancer is the 4th most common cancer in women with an estimated of 528,000 new cases in 2012 and 266,000 deaths. According to the data, the mortality in Mexico for cancer in 2012 was 40,053, with cervical cancer responsible for 11.9% of those deaths [1].

High-risk human papillomaviruses (HPV) are related for the development of cervical cancer [2]. This is achieved through the persistent infection of HPV until later integrates his viral DNA into the host cell. The oncogenic potential of HPV resides in their oncoproteins E6 and E7 that disrupt the cell cycle control. The E6 function of high-risk HPV types is the binding and targeting of p53 for degradation and the function of E7 is binding the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRb) for degradation allowing the release of the transcription factor (E2F) that promotes the expression of numerous genes that control DNA synthesis and cell proliferation [3, 4].

Tumors exhibit a high degree of cellular heterogeneity, and we now believe that only certain cells, known as cancer stem cells (CSC), have the ability to maintain the growth of the tumor mass and the capacity to invade other tissues. The proportion of CSC is variable depending on tumor type and stage [5, 6]. CSCs are undifferentiated cells that have the capacity for self-renewal, chemo-radiation resistance, promoting metastasis and cancer recurrence [7–9]. The presence of CSC has been shown in several types of cancers, such as breast, colon, brain and many others, as identified using the expression of various markers [10–14]. The presence of cervical cancer stem cells (CCSC) has been determined through the expression of CD49f and cytokeratin 17 (CK17) [15, 16].

CD49f, also known as alpha 6 integrin, belongs to the alpha family of integrins and is found on the cell membrane. CD49f has been used as an epithelial stem marker in the human epidermis [17], as an important marker for enrichment of cancer stem cells [18], and described as a target during HPV binding to initiate an intracellular signaling cascade for virus entry [19]. Cytokeratins are proteins that are part of epithelial cells, and their expression depends on the degree of differentiation they acquire. Keratin expression in cervical tissue has been well defined, and it was observed that sub-columnar reserve cells, where the stem cell population of the uterine cervix is found, showed specific expression of CK17 [20]. Identification and characterization of cancer stem cell-like cells from primary carcinomas of the cervix uteri found expression of CK17 [21], suggesting that cells expressing this cytokeratin also as a target of HPV [22]. Our group has previously shown expression of CD49f and CK17 as possible markers for CCSC and that sphere cultures

(cervospheres) are enriched in CCSC showing high tumorigenic in vivo assays compared to their counterparts grown as monolayers [15, 16].

Self-renewal and pluripotency are maintained by the expression of Oct4, Sox2, Klf4, and Nanog on embryonic stem (ES) cells [23–26]. There is evidence that these stemness genes are relevant for tumor transformation, metastasis, and tumorigenicity in human malignancies [27–29]. In clinical terms, chemo and radio-therapy are the gold standard for the treatment of cervical cancer in advanced stages. Depending on the stage of the tumor, the rate of recurrent disease and inefficient treatments could be due to the presence of drug-resistant CSC. For these reasons, different investigations have focused on developing complementary approaches that involve natural compounds that decrease chemo-resistance and reduce the toxic effects of conventional therapies. I₂ exerts significant antineoplastic effects on several types of cancer and multiple mechanisms could mediate its actions. Among these, I₂ can react with arachidonic acid generating the iodolipid called 6-iodolactone (6-IL), which has been confirmed to be an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma (PPAR γ). The activation of these receptors decreases the expression of specific markers associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition [30–34]. Previous studies from our laboratory showed that I₂ impairs chemo-resistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of chemo-resistance markers p21, Bcl-2 and MDR-1 in chemo-resistant MCF-7 cells [35]. In the present work, we showed that in cultures growing as monolayers or cervospheres of HeLa and SiHa cell lines derived from cervical cancer, I₂ was able to inhibit proliferation and the ability to form tumors in mice. This effect includes a decrease in expression of CD49f and CK17 putative stem cell markers and stem transcription factors OCT-4, SOX2, KLF4, NANOG. We propose that in this model, the action of I₂ could be through the activation of the PPAR gamma receptors.

Methods

Cell culture and I₂

Human CC cell lines, HeLa (ATCC@-CRM-CCL-2 T, adenocarcinoma, HPV-18) and SiHa (ATCC@-HTB-35, squamous cell carcinoma, HPV-16), were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Monolayer culture cells were seeded (500,000 cells) in 100 mm cell culture dishes (Corning, Inc., Corning, NY, USA) in 7 mL of medium, grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in DMEM media (Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Molecular iodine was

prepared with 13 g of crystalline iodine (Macron-Avantor, Center Valley, PA, USA) and 60 g of potassium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in one liter of ddH₂O. The iodine concentration was confirmed by titration with a solution of 0.1 N sodium thiosulfate. The use of all cell lines and cell cultures were approved by Research and Bioethics Committees of Instituto Nacional de Cancerología [Prot. No. 018/012/IBI] (CEI/1096/17), Dated 03.02.2018].

Cervospheres

For the formation of cervospheres derived from CC cell lines, monolayer cell cultures were grown to 70–80% confluence and then harvested, counted, and washed with Phosphate buffer solution (PBS) to remove the remainder of FBS. After that, cells were cultured in DMEM F12 media (Gibco®) supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), 10 µL/mL B27 (50X, Gibco®) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a density of 3×10^3 cells/ml in 100 mm ultra-low adherence dishes of (Corning, Inc., Corning, NY, USA). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 3 days and cervosphere formation was monitored daily.

Molecular iodine treatments

The I₂ was previously diluted in culture medium and then added to the cells. The monolayers and spheres cultures of SiHa and HeLa cell lines were treated at a concentration of 200 µM of I₂ for 24 h. After time, cultures were collected and processed for the corresponding tests.

Analysis of markers by flow cytometry

Monolayers and cervospheres treated or untreated with 200 µM of I₂ for 24 h were collected separately and placed in a tube where they were allowed to remain for 15 min. After that time, supernatant was removed and the bottom cells were washed with PBS and spun down at 500 g ($r = 11$ cm) for 5 min at room temperature. Supernatant was removed and cells were resuspended in flow buffer (PBS 1X, 0.05% BSA) and disaggregated by mechanic pipetting. Before incubation with anti-CK17, anti-OCT-4, anti-SOX2, anti-NANOG, and anti-KLF4 antibodies, cells were permeabilized by incubation with methanol for 15 min on ice. Then, cells were washed and incubated with primary antibody. For each primary antibody, 5×10^5 cells were incubated with anti-CD49f-PE (BD Bioscience, CA, USA), anti-CK17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), anti-OCT-4-AlexaFluor488, anti-SOX2-AlexaFluor488 (both BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), anti-NANOG-PE (BD

Bioscience, CA, USA), anti-KLF4-APC (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) for 30 min on ice. After that time, cells were washed with 300 µL of flow buffer and spun down at 500 g ($r = 11$ cm) for 5 min at room temperature. Cells incubated for anti-CK17, after the time elapsed, were washed and incubated with FITC-coupled secondary antibody for 30 min on ice. At the end of the incubation, cells were washed again with flow buffer, spun down, and supernatant was removed. All cells were then washed and fixed with 4% p-formaldehyde in PBS. Every marker was also incubated with isotype controls under the same conditions of the primary antibodies. Stained cells were read in ATTUNE NXT (Thermo Fisher Scientific Inc). At least ten thousand events were recorded for each flow cytometry measurement. FlowJo® software was utilized for analyzing data.

Western blot analysis

The total proteins from HeLa monolayers (confluence 70–80%) and cervospheres treated or untreated with 200 µM of I₂ for 24 h were extracted with RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) supplemented with a complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, USA) and incubated on ice for 20 min. The protein concentrations were measured using the Bradford method (Bio-Rad, USA). Samples containing 70 mg of protein were boiled in SDS containing sample buffer (10% SDS, 20% glycerol, 20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10 mM β-mercapto-ethanol, and 0.05% bromophenol blue), separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat milk in PBS containing 0.1% Tween-20 for 1 h and incubated with the appropriate antibody dilution. The PPAR γ antibody (sc-7196, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:1000 and GAPDH antibody (sc-48167, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:10000. The following HRP-conjugated secondary antibodies were used at a dilution of 1:10000 anti-rabbit (sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and the anti-goat (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:20000. The proteins were visualized through an enhanced chemiluminescence reaction using the Super Signals West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA). Densitometry was performed using ImageJ software (version 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and chemiluminescence was normalized to the level of GAPDH protein.

Total RNA extraction, quantification of mRNA by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA extraction of HeLa monolayers (confluence 70–80%) and cervospheres treated or untreated with 200 μM of I_2 for 24 h was carried out using Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596026), the extracted RNA was treated with DNaseI (ThermoFisher, Cat. No. EN0521) and purified using the Direct-zol™ kit, RNA MicroPrep (Zymo Research, Cat. No. R2060). The purified RNA was quantified using an Epoch™ spectrophotometry system and subjected to retro-transcription with 2000 ng of RNA with the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. No. 18091050) to obtain cDNA. By means of real-time PCR, the cDNA was evaluated to determine the expression levels of the PPAR γ (F-PPAR γ : TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC and R-PPAR γ : GCA TTA TGA GAC ATC CCC AC), PTEN (F-PTEN: GAT GAG GCA TTA TCC TGT ACA CA and R-PTEN: CTC TTC AGA TAC TCT TGT GCT GT) E6 (F-E6: GCG ACC CTA CAA GCT ACC TG and R-E6: GTT GGA GTC GTT CCT GTC GT) and E7 (F-E7: TGA AAT TCC GGT TGA CCT TC and R-E7: CAC GGA CAC ACA AAG GAC AG) genes. The oligonucleotides for the GAPDH gene (F-GAPDH: AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT G and R-GAPDH: CCA TGG GTG GAA TCA TAT TGG AA) were used as control. Placing 100 ng of cDNA, 12.5 μL of the master mix Maxima SYBR and 10 pmol of each oligonucleotide in a total volume of 25 μL carries out real-time PCR. The reaction conditions are 95 °C for 10 min for initial denaturation, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s for denaturation, alignment and extension, respectively. The reaction was performed on the QIA-GEN Rotor-Gene Q equipment. The expression levels of the mRNAs were determined from the threshold cycle (Ct), and the relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. For mRNA quantification, the Ct values were normalized to the expression of the GAPDH mRNA level.

Viability assay

The effects in viability of HeLa and SiHa monolayers treated or untreated with 100, 200 and 400 μM of I_2 for 24 h and HeLa cervospheres treated or untreated with 200 μM of I_2 for 24 h, were analyzed using the OZBlue Cell Viability Kit (OZ Biosciences, San Diego, USA) following the supplier's instructions.

Animals and in vivo tumorigenic assays

This study was approved by Research and Bioethics of Instituto Nacional de Cancerología's Committee [Prot. No. 018/012/IBI] (CEI/1096/17), Dated 03.02.2018]. NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency) female mice were used in this work to test the tumorigenic capacity of CCSC-like I_2 -treated and untreated. The animals

were 4–6 weeks old, weighed 21–25 g and were obtained from the Unidad de Modelos Biológicos of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. After acclimation in the bioterium of Instituto Nacional de Cancerología, they were randomly designated to experimental groups. Mice were xenotransplanted subcutaneously (s.c) with HeLa monolayer cells and their respective cervosphere cells treated or untreated with 200 μM of I_2 for 24 h at different amounts using six mice per group. Throughout experiment, mice lived in a room with 12-h/12-h light/dark cycle, at a temperature of 27 °C, 60% of relative humidity and had free access to chow and water. Mice were monitored for at least 2 months. The handling and execution of experimental procedures in mice were carried out according with local and international guidelines such as the official Mexican standard NOM-062-ZOO-1999 (Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals), the code of ethics of IIB–UNAM and other international guidelines. For subcutaneous tumors in mice, the maximal allowable size is 2 cm in diameter (Tumor Policy for Mice and Rats from Boston University Research Compliance). Tumor growth was monitored three times a week for up to 8 weeks. At the end of the 8 weeks, a humanitarian final point was made; the mice were euthanized in a compressed CO_2 chamber. After that, tumors were extracted through a cut made in the skin and they were measured, weighed and photo-documented. Each tumor was measured by a vernier caliper and the tumor volume was calculated using the Attia-Weiss formula "Tumor volume = (0.4) (a) (b ^ 2)", where "a" is the largest diameter and "b" the smallest diameter of each tumor.

Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism software (v 6.0; GraphPad Software, Inc., CA, USA). One or two-way ANOVA was performed to determine the significance of differences between groups. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and values with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Molecular iodine interferes with viability of HeLa and SiHa monolayer cell cultures and cervosphere formation of HeLa

A dose-response curve (100 μM , 200 μM , 400 μM) of I_2 for 24 h was carried out to evaluate cell viability under adherent (monolayer) culture conditions of HeLa and SiHa cells (Fig. 1a). HeLa cells were slightly more resistant than SiHa at 100 μM I_2 and the antiproliferative effect of I_2 exhibited a sustained dose-response in both cell types. To evaluate a possible effect of I_2 in CCSC-like cells, since 400 μM I_2 showed high cytotoxicity, we selected 200 μM I_2 for further experiments. A supplement

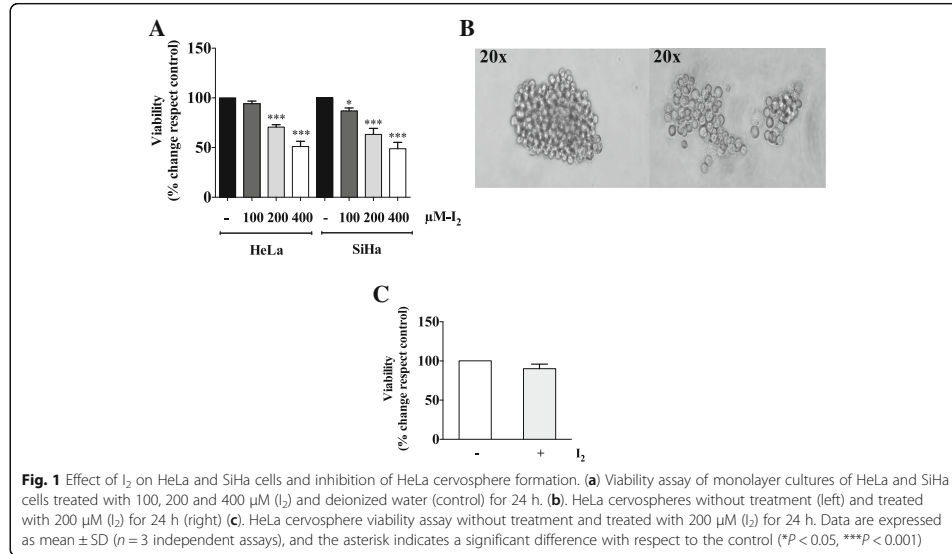


Fig. 1 Effect of I₂ on HeLa and SiHa cells and inhibition of HeLa cervosphere formation. **(a)** Viability assay of monolayer cultures of HeLa and SiHa cells treated with 100, 200 and 400 μM I₂ and deionized water (control) for 24 h. **(b)** HeLa cervospheres without treatment (left) and treated with 200 μM I₂ for 24 h (right) **(c)** HeLa cervosphere viability assay without treatment and treated with 200 μM I₂ for 24 h. Data are expressed as mean ± SD (n = 3 independent assays), and the asterisk indicates a significant difference with respect to the control (*P < 0.05, ***P < 0.001)

of 200 μM I₂ (24 h) interfered with HeLa cervosphere formation, since the I₂-treated cervospheres were observed to be smaller, with irregular conformation compared to the untreated cervospheres (Fig. 1b), however, cell viability wasn't affected (Fig. 1c).

CD49f expression in HeLa cervospheres and SiHa monolayer and cervosphere cultures is inhibited by molecular iodine

CD49f protein was evaluated under non-adherent conditions (cervospheres) for 7 days (data not shown). On the third day, we found the highest protein level of CD49f suggesting a significant proportion of cancer stem cell-like cells. Monolayer and cervospheres were treated on the second day with 200 μM I₂ or deionized water (control) for 24 h. I₂ was effective in reducing the expression of CD49f in HeLa and SiHa cervospheres and their respective monolayers, even the expression of CD49f in HeLa monolayer is very low, treatments with molecular iodine decreased its expression, although not to significant levels under these treatment conditions (Fig. 2).

Molecular iodine significantly reduces CK17 in both HeLa and SiHa monolayer and cervosphere cultures

CK17 is a marker for cervical stem cell identification [16, 21] and is an essential marker for the identification of CCSC. As with the CD49f molecular iodine assay, HeLa and SiHa cervospheres and monolayer cells were treated on the second day with 200 μM of I₂ or deionized water

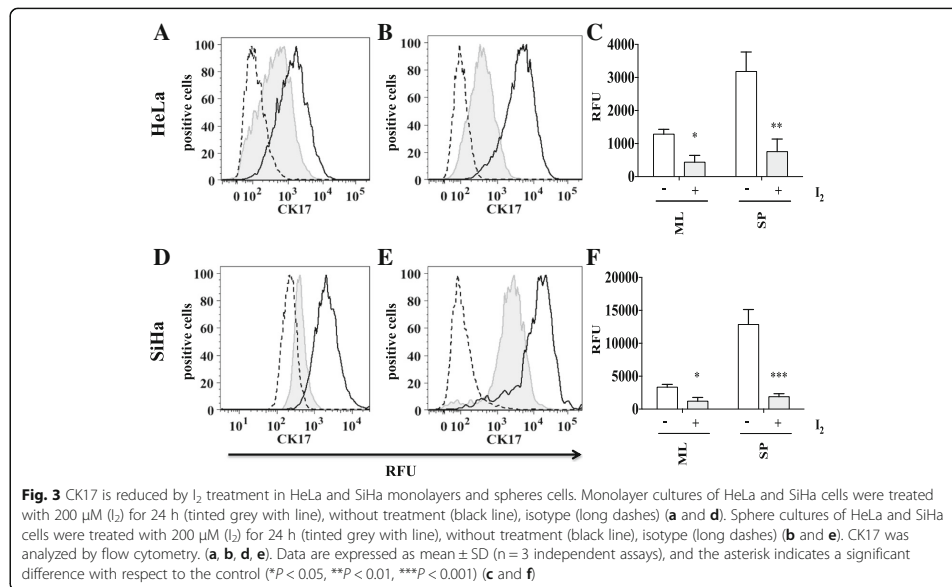
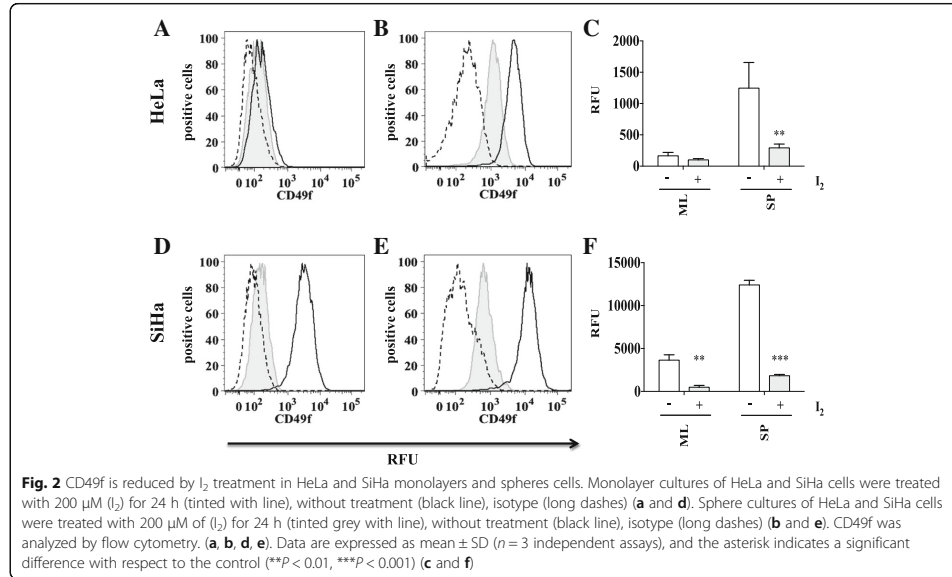
(control) for 24 h. Cytometry analysis showed that I₂ was capable of decreasing CK17 protein levels in both HeLa and SiHa cells under monolayer and cervosphere conditions (Fig. 3).

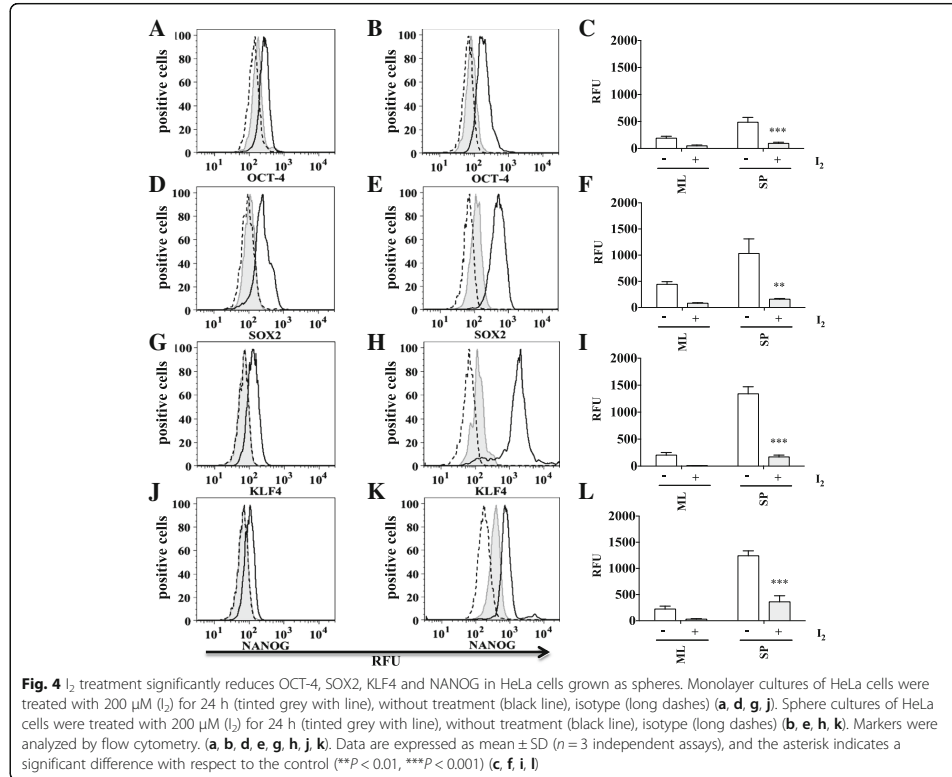
OCT-4, SOX2, KLF4 and NANOG stemness markers are significantly reduced by molecular iodine treatment only in HeLa and SiHa cervospheres

Identifying stemness markers such as OCT-4, SOX2, KLF4, and NANOG is needed to evaluate stemness of our cervospheres. We evaluated these transcription factors in HeLa and SiHa cells grown as monolayers and cervospheres in the presence or absence of I₂ treatment. As expected, we found more stemness marker proteins in cervospheres compared to monolayer cells. Interestingly, OCT-4, SOX2, KLF4, and NANOG markers were down regulated by I₂ treatments in both cervosphere and monolayer cultures of HeLa (Fig. 4) and SiHa (Fig. 5) cells.

Activation of PPAR gamma is up-regulated by molecular iodine treatments in HeLa cells

It has been proposed that the antineoplastic effect of the molecular iodine is mediated by activation of PPARγ receptors by 6-iodolactone, in turn causing an increase in these receptors after treatment [33, 34]. Monolayer and cervospheres of HeLa cells were incubated with 200 μM of I₂ for 24 h, resulting in a significant increase in PPAR gamma proteins compared to their untreated counterparts (Fig. 6a, b). To corroborate the activation of PPARγ we





analyzed the expression of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), a known PPAR γ -regulated gene (reviewed in [36]). Figure 6c shows that I₂-supplemented HeLa cells exhibit significant increase of PTEN gene expression in both monolayers and cervospheres. This result indicates that the mechanism of the antineoplastic effects of molecular iodine could be through PPAR gamma. Figure 6d, e shows the effect of I₂ on HPV18 E6 and E7 gene expression, resulting in a significant reduction of E6 and E7 expression in monolayers cells and no effect in cervospheres treated with I₂.

Molecular iodine treatments decrease the capacity for tumor formation of HeLa cervospheres

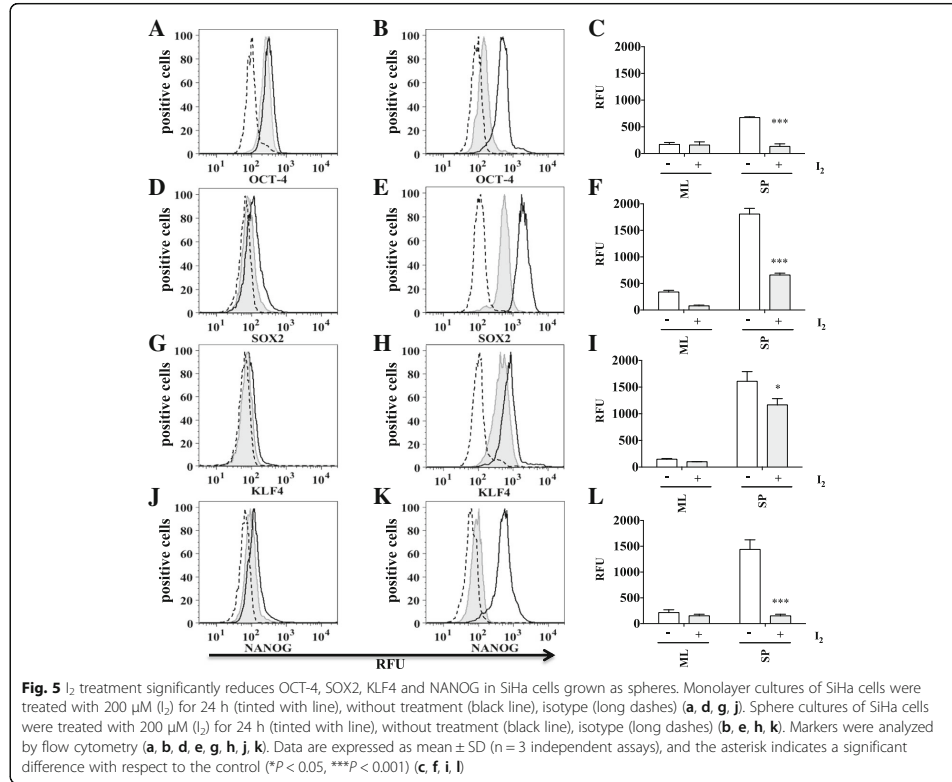
It has been demonstrated that cervospheres have higher tumorigenic capacity compared to their monolayer counterparts (15,16). In this paper, we evaluated the effect of I₂ treatments on cervosphere tumorigenic capacity using an in vivo assay. Mice were inoculated with HeLa cervospheres

pre-incubated for 24 h with 200 μM I₂ or deionized water. Each animal was inoculated with both populations on the left or right side, respectively (Fig. 7a).

Figure 7b, c show that I₂-treated cervospheres promoted smaller tumors in 6/6 mice, suggesting an anti-tumorigenic effect of I₂ on these cervical cancer highly tumorigenic cells, as characterized by CD49f, CK17 and stemness markers. Tumors began to grow from 17 days after inoculation in the mice and tumor growth was evaluated for 49 days. We observed that untreated cervospheres formed bigger tumors with a maximum average size of 594.9 mm³ whereas the cervospheres treated with I₂ formed tumors of much smaller size, with a maximum average size of 150.8 mm³ (Fig. 7d). No adverse events were found in the experimental groups.

Discussion

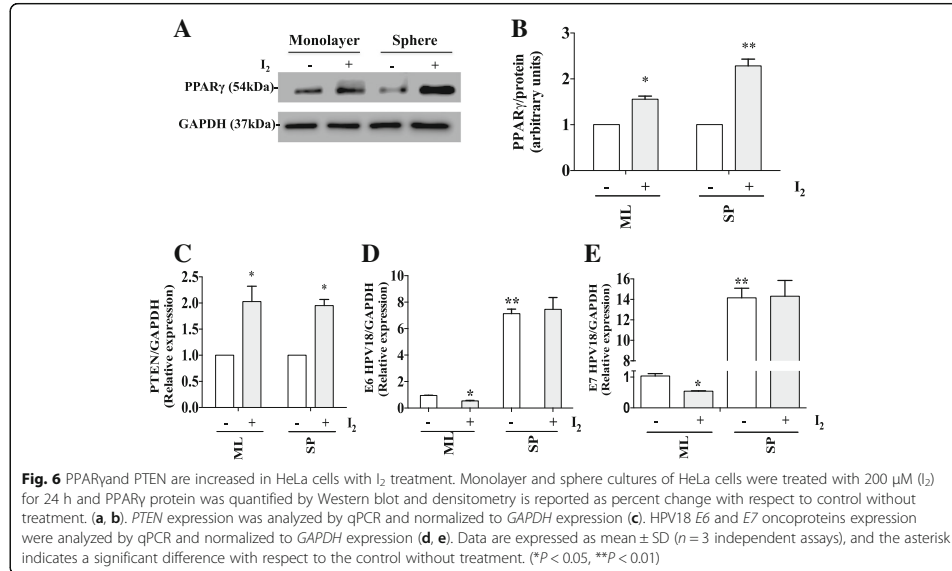
The percentage of cancer stem cells is very low in tumors, which makes it difficult to study them. Spheroidal



cultures have been shown to enrich CSC-like cells and are a good system to evaluate CSC-related characteristics of solid tumors in vitro [37], but according to Blagosklonny (reviewed in [38]), these cells should be called stemoids since they possess high proliferation capacity, self-renewal and could be responsible for the reappearance of cancer after therapy. Many studies evaluate the biology of CSC and the mechanisms that give them chemo-resistance capacity. CSC shows resistance to many chemotherapeutics such as cisplatin, 5-FU, and doxorubicin. This is achieved through their high expression of pro-survival proteins, efficient ABC transporters to pump out drugs, signaling pathways that give them resistance properties, and much higher activated phosphorylation of DNA damage response factors [39–42]. Several strategies have been used to inhibit all these properties but they have not been enough, so the chemo-resistance of CSC requires new approaches aimed at eliminating these highly tumorigenic cells.

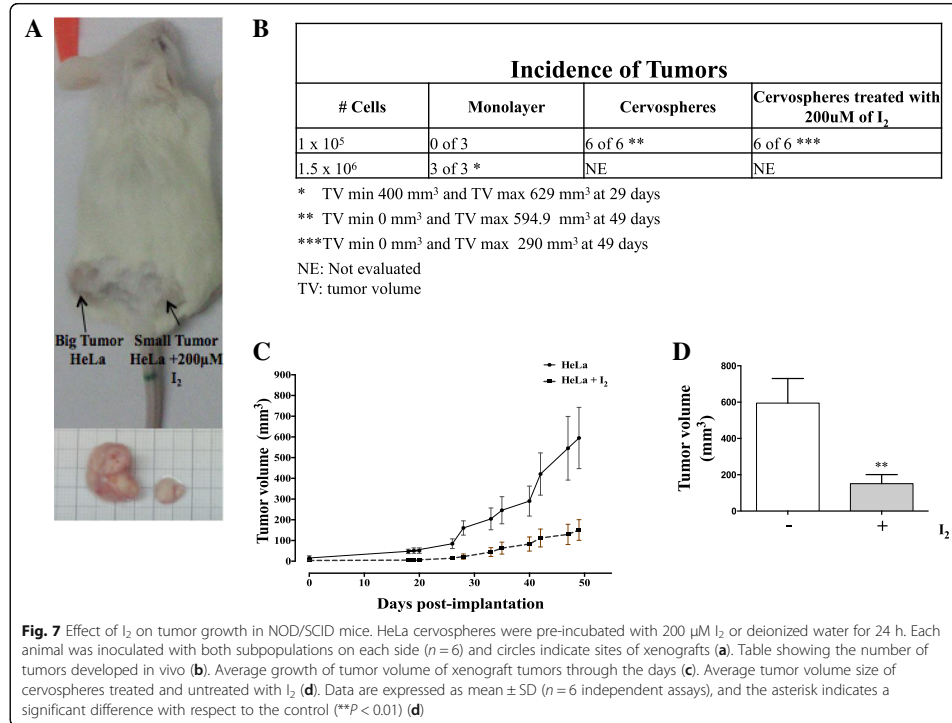
Molecular iodine has been studied in several cancer cell lines showing its ability to inhibit proliferation,

chemo-resistance, and apoptotic effects [30–35], however there are no reports on its effect on cervical cancer cell lines nor on cultures enriched with cancer stem-like cells. HeLa and SiHa are the most representative cervical cancer cell lines and in this study, we used cultures grown under non adherent conditions (cervospheres) where we obtained a higher proportion of CSCC-like cells compared to traditional monolayer cultures, allowing us to study the effect of I₂ on CSC derived from cervical cancer cell lines. We showed that I₂ treatment decreased cervosphere formation, additionally, we observed living cells and some dead cells in these spheres; however, we do not know whether I₂ treatment induces death in CCSC-like cells. Our group, as well as other authors, has proposed CD49f and CK17 as putative markers to isolate cervical cancer stem cells [15, 16]. CD49f is considered to be a stem cell marker for normal and cancer cells and is the only marker that is shared by more than 30 stem cell populations, being one of its main characteristics the maintenance of self-renewal (reviewed in [43]). It's also a crucial



molecule for the growth and survival of the breast stem cell-like subpopulation that displays increased proliferation and greater resistance to pro-apoptotic agents [44]. The importance of CD49f in cervical cancer is enhanced by its ability to act as a co-receptor for the entry of HPV into the host cells [45, 46]. CK17 is a marker of the HPV target cell, the cervical reserve (stem) cell which gives rise to metaplasia, and loss of CK17 induces cellular differentiation and attenuates tumorigenesis in cervical epithelia [21, 22, 47, 48]. We observed that cells treated with I₂ show a decrease in CD49f and CK17 protein expression, molecules considered to be CCSC phenotype markers (reviewed in [43, 49]). Since CD49f is important for maintaining stem cell self-renewal, we hypothesize that the decrease in CD49f+ cells caused by I₂ could have an important effect on the CCSC-like biology, including tumorigenic capability. To validate the tumorigenic capability of a human cancer cell line, xenotransplantation must be performed in immunodeficient mice, a model used to promote tumor growth derived from human cancer for the analysis of malignant tumors and the evaluation of antitumor drugs [50]. Since I₂ exhibited similar effects on HeLa and SiHa cell lines, we decided to use only HeLa cells for in vivo experiments to evaluate its effect over CCSC. Mice assays, using I₂-treated cells, we observed that I₂ treatment delays tumor growth, and make them unable to keep the tumor growing, suggesting that I₂-treated CCSC-like cells have a lower capacity for tumor formation compared

to non-treated CCSC-like cells. However, since the cells are still alive after I₂ treatment, it's clear that I₂ treatment can help reduce their tumorigenic capability as observed through the reduction of tumor size and delayed tumor growth. Evaluation of HeLa monolayer cells treated with I₂ were not pursued, since we focused our interests in evaluating the effect of I₂ in cancer stem-like cells. Additionally, the effect of I₂ on CCSC-like cells was observed by evaluating stemness markers, such as NANOG, SOX2, KLF4 and OCT-4, in cervospheres. It has been demonstrated that there is an increase in expression of these stemness markers in cervical carcinomas, compared with normal cervical tissue, and that their overexpression in cell lines derived from cervical cancer confers them an increased capacity for proliferation, clonogenicity, and tumorigenicity in vitro and in vivo, as well as promoting stem cell characteristics [51–54]. Interestingly, we observed different stemness marker levels between HeLa and SiHa cervospheres, mainly in KLF4 and SOX2 protein levels. This indicates that the mechanisms for self-renewal could be cell type-dependent. Our cervospheres showed overexpression of these stemness markers compared with their monolayer counterparts, as reported [15, 16]. Furthermore, I₂ had the ability to decrease their expression in cervospheres, supporting a role for I₂ in decreasing the tumorigenic capacity of these cancer cells, because as reported in the literature, the decrease of these stem cell markers makes the cancer cells less tumorigenic



[27–29, 54]. The mechanism proposed by which I₂ decreases cell proliferation is through the interaction and activation of the PPAR gamma receptor [34, 55]. In this work we show that in CCSC-like cells derived from I₂-treated cervical cancer cell lines, PPAR gamma protein level was increased compared to untreated CCSC-like cells. As consequence, PPAR gamma activation promotes greater expression of its target gene, PTEN [56], in our CCSC-like cultures compared to their monolayer counterparts. These observations suggest that the mechanism whereby I₂ decreases CD49f, CK17 and stemness markers in CCSC-like cells could be mediated by the activation of PPAR gamma receptors and consequently the activation of its PTEN response gene involved in self-renewal mechanisms. In addition to decreasing self-renewal capacity, PTEN activation reduces cell proliferation and tumorigenicity in CSC (reviewed in [57]). However, additional assays are needed to further address the mechanism by which I₂ is able to decrease the tumor volume derived from CCSC-like cells.

Tyagi and collaborators demonstrated that the increase of E6 and E7 gene expression is close related with

the stemness mediated by HES1, a specific transcription factor of NOTCH signal pathway [58]. In our conditions, we also observed an increase of E6/E7 expression in spheres cultures. Interesting, I₂ treatment decrease the E6/E7 expression in HeLa monolayer cell culture conditions, an effect that was no observed in sphere culture conditions, suggesting that I₂ doesn't have any effect on E6/E7 HPV18 gene expression in CCSC-like.

Conclusions

In resume, our results demonstrate the I₂-mediated cytotoxic effect in CSC derived from cervical cancer cell lines, in which CD49f, CK17 and stemness marker positive cells are decreased. Since I₂ supplements are considered to be safe for the treatment of diseases such as human mammary fibrocystic disease, breast cancer or prostate hyperplasia (reviewed in [30]), we suggest that I₂ treatment for cancer should be studied in preclinical trials to evaluate its potential anti-cancer effect alone or in a combination with conventional therapeutic drugs, to eliminate cancer stem cells from cervical cancer and others.

Abbreviations

6-IL: 6-iodolactone; CCSC: Cervical cancer stem cells; CSC: Cancer stem cells; ES: Embryonic stem; HPV: Human papillomaviruses; I₂: Molecular Iodine; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor type gamma; PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

Acknowledgments

We thank the LABNALCIT-UNAM (CONACYT) for the technical support in the acquisition of flow cytometry samples, Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México for grant support to GDB-O, Miriam Guido for technical assistance, Iván Velasco, Ph.D, for critical and academic support, Cody Howe, Joseph Bires for proofreading and Elizabeth Langley McCarron, Ph.D, for proofreading and critical discussion. This manuscript is part of the doctoral dissertation project of Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez, a student of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México grant 0253804 to AG-C) and Instituto Nacional de Cancerología (INCan to AG-C), Secretaría de Salud (México). The funding bodies had no role in the design of the study, collection, analysis, interpretation of data and, in writing the manuscript. Funding was for purchase of chemicals and kits required for conducting the study. CONACYT-México grant (4141259) and SENESCYT (Ecuador), were fellowships to support the doctoral studies of Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez.

Availability of data and materials

The data analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

GDB-O performed all the experiments, participated in scientific discussions and wrote the manuscript; EO-S performed flow cytometry assays and participated in scientific discussions; PR-C performed RT-qPCR assays; HAV-G performed in vivo tumorigenic assays; CA and AG-C provided the concept design and scientific direction, led scientific discussions and contributed to editing and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval

The Committee for Research Ethics and for Animal Care and Use in Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City (Mexico) approved the present study [Prot. No. 018/012/IB] (CEI/1096/17)]. We handled animals in compliance with the revised Animals (Scientific Procedures) Act 1986. This article adheres to the ARRIVE guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>) for the reporting of animal experiments.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹División de Investigación Básica, Laboratory of Virus and Cancer, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Av. San Fernando No. 22, Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CP, Mexico. ²Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, Mexico City, Mexico. ³Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico. ⁴Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Campus-Juriquilla, Querétaro 76230, Qro, Mexico. ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

Received: 8 March 2018 Accepted: 14 September 2018

Published online: 26 September 2018

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50.
3. Boulet G, Horvath C, Broeck VD, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):2006–11.
4. Ueno T, Sasaki K, Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, Nakamura H, Sakai H. Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene*. 2006;25(30):4155–64.
5. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(2):71–7.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105–11.
7. Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, Andrusis M, Schirmacher P, Sinn HP. Reduction of CD44(+)/CD24(–) breast cancer cells by conventional cytotoxic chemo-therapy. *Hum Pathol*. 2010;41(4):574–81.
8. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncol*. 2012;13(2):e83–9.
9. Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:1730–8.
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–8.
11. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106–10.
12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.
13. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:1–5.
14. Hardavella G, George R, Sethi T. Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):272–9.
15. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carranca A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 2012;12:48.
16. Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñoz-Hernández S, Garrido E, Cantú De León D, García-Carranca A. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*. 2016;7(22):31943–54.
17. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 2004;72(8):387–95.
18. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):425–30.
19. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013;87(11):6062–72.
20. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1992;140(3):601–12.
21. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res*. 2004;24(2B):771–775.
22. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep*. 2009;22(5):1129–34.
23. Rosner MH, Vignano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirie F, Rigby PWJ, Staudt LM. A pou-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345(6277):686–92.

24. Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol*. 2006;26(20):7479–91.
25. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):15–30.
26. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*. 2005;105(2):635–7.
27. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499–507.
28. Tai SK, Yang MH, Chang SY, Chang YC, Li WY, Tsai TL, Wang YF, Chu PY, Hsieh SL. Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2011;102(4):895–902.
29. Wang Y-D, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis*. 2013;4:e760.
30. Rosner H, Torremante P, Moller W, Gartner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;118(7):410–9.
31. Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E, Rossi G. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*. 2000;141(2):598–605.
32. Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1003–11.
33. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojórquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009;89(1–2):34–42.
34. Nava-Villalba M, Aceves C. 6-iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2014;112:27–33.
35. Bontempo A, Ugalde-Villanueva B, Delgado-González E, Rodríguez AL, Aceves C. Molecular iodine impairs chemoresistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of the CD44+/CD24+ and E-cadherin+/vimentin+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low doses of doxorubicin. *Oncol Rep*. 2017;38(5):2867–76.
36. Teresi RE, Waite KA. PPARgamma, PTEN, and the fight against Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:932632.
37. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):283–9.
38. Blagosklonny MV. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007;6:1684–90.
39. Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Dono K, et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2009;100:1647–58.
40. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, Beckmann JS, Joseph JM, Muhlethaler-Mottet A, Gross N. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene*. 2009;28:2245–56.
41. Gallmeier E, Hermann PC, Mueller MT, Machado JG, Ziesch A, De Toni EN, Palagyi A, Eisen C, Ellwart JW, Rivera J, et al. Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the in vitro and in vivo tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133(+) tumor-initiating cell fraction. *Stem Cells*. 2011;29:418–429.36.
42. Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun*. 2009;9:4.
43. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The role of integrin in stem cells: more than a conserved biomarker. *Stem Cells Dev*. 2017;26(15):1090–9.
44. Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, Purushotham AD. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2008;122(2):298–304.
45. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999;261(2):271–9.
46. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, Mc Millan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997;71(3):2449–56.
47. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 2007;50(5):629–35.
48. Hobbs RP, Batazzi AS, Han MC, Coulombe PA. Loss of keratin 17 induces tissue-specific cytokine polarization and cellular differentiation in HPV16-driven cervical tumorigenesis in vivo. *Oncogene*. 2016;35(43):5653–62.
49. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):598–602.
50. Engel AM, Schou M. Assay of tumorigenicity in nude mice. In: Cells JE, Carter NP, Simons K, Small JV, Hunter T, Shotton DM, editors. *Cell biology: a laboratory handbook*. Burlington: Eds. Elsevier Academic; 2006. p. 353–7.
51. Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87092.
52. Li SW, Wu XL, Dong CL, Xie XY, Wu JF, Zhang X. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118033.
53. Mak VC, Siu MK, Wong OG, Chan KK, Ngan HY, Cheung AN. Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. *Histol Histopathol*. 2012;27(9):1121–30.
54. Ding Y, Yu AQ, Wang XL, Guo XR, Yuan YH, Li DS. Forced expression of Nanog with mRNA synthesized in vitro to evaluate the malignancy of HeLa cells through acquiring cancer stem cell phenotypes. *Oncol Rep*. 2016;35(5):2643–50.
55. Nava-Villalba M, Nuñez-Anita RE, Bontempo A, Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Mol Cancer*. 2015;14:168.
56. Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA, Eng C. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by lovastatin and rosiglitazone. *Int J Cancer*. 2006;118(10):2390–8.
57. Ciuffreda L, Falcone I, Incani UC, Del Curatolo A, Conciatori F, Matteoni S, Vari S, Vaccaro V, Cognetti F, Milella M. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv Biol Regul*. 2014;56:66–80.
58. Tyagi A, Vishnoi K, Mahata S, Verma G, Srivastava Y, Masaldan S, Roy BG, Bharti AC, Das BC. Cervical Cancer stem cells selectively overexpress HPV Oncoprotein E6 that controls Stemness and self-renewal through upregulation of HES1. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4170–84.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO II

Índice de figuras

Figura 1.- Características del cáncer

Figura 2.- Modelo de desarrollo del cáncer cervicouterino

Figura 3.- Organización genómica de los virus del papiloma humano

Figura 4.- Modelos de heterogeneidad tumoral

Figura 5.- Modelo esquemático que correlaciona la expresión de ITGA6 (CD49f) con la capacidad troncal y tumorigénica de las células

Figura 6.- Red reguladora transcripcional

Figura 7.- Tratamientos actuales contra el cáncer

Figura 8.- Mecanismo del yodo molecular

Figura 9.- Diseño experimental

Figura 10.- Efecto de I₂ sobre las células HeLa y SiHa e inhibición de la formación de las cervoesferas de HeLa

Figura 11.- CD49f se reduce por los tratamiento con I₂ en monocapas y esferas de HeLa y SiHa

Figura 12.- CK17 se reduce mediante tratamiento con I₂ en monocapas y esferas de HeLa y SiHa

Figura 13.- El tratamiento con I₂ reduce significativamente OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG en células HeLa cultivadas como esferas

Figura 14.- El tratamiento con I₂ reduce significativamente OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG en células SiHa cultivadas como esferas

Figura 15.- PPAR γ y PTEN aumentan en las células HeLa con tratamiento de I₂

Figura 16.- Efecto de I₂ en el crecimiento tumoral en ratones NOD/SCID