



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Papel de la vía Wnt en las células troncales de cáncer cervico uterino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN MANUEL GUTIÉRREZ VILLÁN

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, CDMX. Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la dirección y supervisión de la Dra. Elizabeth Ortíz Sánchez y el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo la asesoría académica del comité tutorial integrado por:

Dra. Marcela Lizano Soberón
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá

Se reconoce:

La asesoría técnica a la

Dra. Alexandra Rodríguez Sastre del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El apoyo en su laboratorio al

Dr. Emilio Rojas del Castillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El apoyo en el trabajo de laboratorio a la

QFB Josefina García Rojas del Instituto Nacional de Cancerología.

Para la realización de los estudios de maestría se recibió la beca de CONACYT bajo los números de CVU/Becario: 421013/262001

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES, siempre a ellos

Victoria Villán Sánchez

Enrique Gutiérrez Álvarez

A Dios

Contenido

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
I. RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
II. ANTECEDENTES	7
CÁNCER, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.....	7
CÁNCER CERVICO- UTERINO.....	8
CÉLULAS TRONCALES	11
CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	13
IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES.....	18
VIA Wnt/ β -catenina	21
Vía Canónica Wnt/ β -catenina.....	22
Vía canónica Wnt/ β -catenina inactiva	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
IV. HIPOTESIS.....	32
V. OBJETIVOS.....	32
VI. METODOLOGÍA.....	33
VII. RESULTADOS.....	37
β -catenina, principal efector de la vía.....	37
Complejo de Destrucción de β -catenina.....	38
Axina 1.....	38
Cinasa Gsk3 β	39

Cinasa Ck1 α	39
β -catenina fosforilada.	40
Otras proteínas.	41
Dishevelled 1 (Dvl 1).....	41
Dkk 1.....	41
β -catenina en la línea celular HeLa de cáncer cervico uterino.	42
VIII. DISCUSIÓN.....	44
IX. CONCLUSIONES.....	53
X. REFERENCIAS	54

<i>Figura 1.</i> Porcentaje de Incidencia y Mortalidad de casos de cáncer en ambos sexos en 2018 en los diferentes continentes en el mundo.....	7
<i>Figura 2.</i> Estimación de la Incidencia de cáncer en México en 2018.....	9
<i>Figura 3.</i> Modelo de Secreción de Wnt.....	22
<i>Figura 4.</i> Vía canónica Wnt/ β -catenina inactiva.....	24
<i>Figura 5.</i> Cuando la vía canónica Wnt/ β -catenina está activa en presencia de Wnt, β -catenina se trasloca al núcleo.....	26
<i>Figura 6.</i> Los niveles de la proteína β -catenina son mayores en los cultivos enriquecidos con células troncales cancerosas (cultivos en esfera).....	37
<i>Figura 7.</i> Los niveles de Axina 1, regulador negativo de la vía canónica, son menores en los cultivos en esfera.....	38
<i>Figura 8.</i> Los niveles de la proteína GSK3- β –regulador negativo de la vía- son mayores en los cultivos en monocapa.....	39
<i>Figura 9.</i> La cantidad de la proteína CK1 α es mayor en los cultivos en esfera.....	40
<i>Figura 10.</i> La cantidad de la proteína p_ β -catenina es mayor en los cultivos en esfera.....	40
<i>Figura 11.</i> Los niveles de la proteína DVL 1 (Dishevelled), reguladora positiva de la vía Wnt/ β -catenina, son mayores en los cultivos en esfera.....	41
<i>Figura 12.</i> Los niveles de Dkk 1 en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa son mayores en los cultivos en esfera.....	42
<i>Figura 13.</i> Los niveles de la proteína β -catenina en cultivos en monocapa y en esfera de la línea celular HeLa de CaCU son opuestos a los encontrados en la línea celular SiHa.....	43
<i>Figura 14.</i> Mayores niveles de proteínas que actúan como reguladores positivos y menores niveles de proteínas que actúan como reguladores negativos en la vía wnt/ β -catenina.....	52
<i>Tabla 1.</i> Marcadores de superficie de células troncales cancerosas de diferentes tumores.....	19

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
WHO	Organización Mundial de la Salud
CaCU	Cáncer cervicouterino
VPH	Virus del Papiloma Humano
CSC	Células Troncales Cancerosas
IPS	Células Pluripotentes Inducidas
TICs	Células Iniciadoras del Tumor
NOD	Diabéticos No Obesos
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
AML-ICs	Células Iniciadoras de Leucemia Mieloide Aguda
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
SFB	Suero Fetal de Bovino
DE	Desviación Estándar
URI	Unidades Relativas de Intensidad
EMT	Transición Epitelio Mesénquima

RESUMEN

El cáncer sigue siendo un problema muy grave de salud en todo el mundo, con casi 18 millones de nuevos casos en 2018, y cerca de 10 millones de muertes a nivel mundial en el mismo año. Se proyectan más de 22 millones de nuevos casos de cáncer para el 2030. Es entonces imprescindible encontrar nuevas formas de combatir esta enfermedad, y uno de los blancos terapéuticos en la mira en años recientes es el conjunto de células conocidas como “Cancer Stem Cells” (Células Troncales Cancerosas), sub-población celular que se piensa está presente dentro de la masa tumoral de cualquier cáncer, y que parece ser la responsable del mantenimiento y progresión del cáncer. Uno de los modelos de estudio son los cultivos celulares tumorales enriquecidos con células troncales, que se caracterizan por su crecimiento en esfera. Cultivos celulares en esfera de cáncer cervico uterino (cervico esferas) han sido ya parcialmente caracterizados. En nuestro trabajo analizamos por western blot proteínas que forman parte de la vía canónica wnt/ β -catenina y encontramos indicios de una actividad mayor de esta vía en los cultivos en esfera en la línea celular SiHa de cáncer cervico uterino, en comparación con los cultivos celulares tradicionales en monocapa. Entre estos indicios está una cantidad mayor de la proteína β -catenina, principal efector de la vía, que activa genes blanco cuando se trasloca al núcleo, así como de otras proteínas que tienen un papel regulador positivo en la vía. Esta vía canónica se ha encontrado alterada en muchos tipos de cáncer, y se le relaciona con el crecimiento de la masa tumoral. No obstante, esta mayor activación de la vía canónica no es común a todas las cervico esferas de diferentes líneas celulares. El caracterizar mejor estos modelos de estudio nos permitirá encontrar nuevas armas terapéuticas para combatir esta enfermedad de una manera más eficaz.

“The simplest view appears to me undoubtedly to be that in an early stage of embryonic development more cells are produced than are required for building up the part of concerned, so that there remains unappropriated a quantity of cells –it may be very few in number- which, owing to their embryonic character, are endowed with a marked capacity for proliferation....The only point on which I lay stress is that the real cause of the subsequent tumour is to be sought in a fault or irregularity of the embryonic rudiment.”

Julius Cohnheim,
1889.

ABSTRACT

Cancer keeps on being a severe health problem all around the world, with almost 18 million new cases in 2018, and 10 million deaths worldwide in the same year. It's thought that there will be over 22 million new cases of cancer in 2030. It's necessary to find new ways to fight this sickness, and one of the therapeutic targets in sight in recent years is the set of cells known as Cancer Stem Cells (CSC), cell sub-population that is thought to be part of any tumor and that seems to be responsible for cancer support and progression. One of the study models are the CSC-enriched cell cultures with a characteristic sphere growing. Sphere cultures of cervical cancer (cervospheres) have already been partially characterized. In our work we analyzed by western blot technique proteins that are part of the canonic pathway wnt/ β -catenin, and we found signs that this pathway has a higher activity in these CSC-enriched cell cultures in the SiHa cell line compared with the traditional monolayer culture. Among these signs we observed a higher level of proteins such as β -catenin, a key protein that traslocates to the nucleus turning on target genes, as well as other proteins that play a positive regulator role. This canonic pathway has been found aberrant in many kinds of cancer, and it is related with tumor growing. However, this higher activity is not shared by all cervospheres of cervix cancer cell lines. The better we characterize these models, the better therapeutic weapons we will find to fight this sickness in a better way.

II. ANTECEDENTES

CÁNCER, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

El cáncer continúa siendo un grave problema de salud y en 2015, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO), ocupó el primer lugar como causa de muerte en menores de 70 años por encima de afecciones cardíacas en 91 países (EU, Canadá, Australia, gran parte de países en Europa y algunos en Sudamérica) (Bray F, et al, 2018). Así también, los tumores asociados a un “estilo de vida occidental”, que incluye una mayor ingesta de productos animales y grasas saturadas (Gersten O & J Wilmoth, 2002), están desplazando en números a los asociados a infecciones y pobreza (Bray F, et al, 2018), en la llamada “transición del cáncer” (Bray F, et al, 2012). De esta manera, tumores como el de mama están en primeros lugares de incidencia a nivel mundial, desplazando a aquéllos asociados a infecciones como el de estómago e hígado. Datos de Globocan estimaron 18 078 957 nuevos casos de cáncer para 2018 a nivel mundial y 9 555 027 muertes por esta enfermedad. Alrededor de la mitad de nuevos casos y muertes se registran en Asia (**Figura 1**), en parte debido al hecho de que casi 60 % de la población mundial

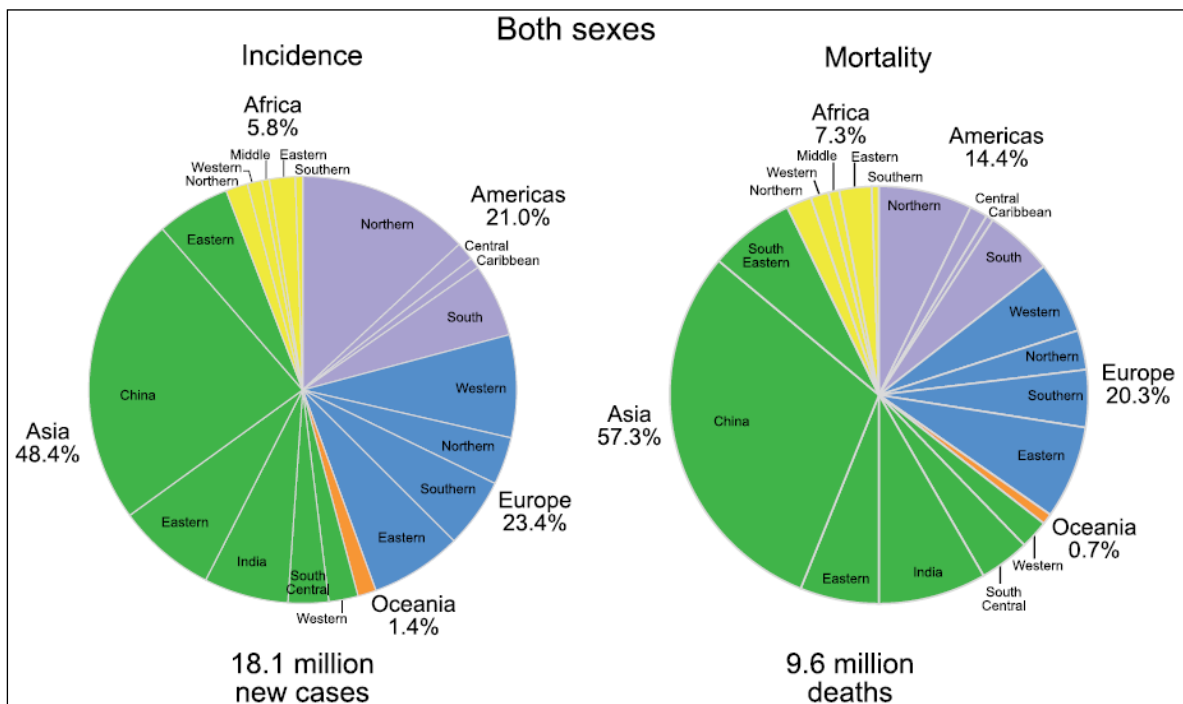


Figura 1. Porcentaje de Incidencia y Mortalidad de casos de cáncer en ambos sexos en 2018 en los diferentes continentes en el mundo. Asia: verde, África: amarillo, América: morado, Europa: azul, Oceanía: naranja. (Tomado de Bray F, et al, 2018).

vive en esa región (Bray F, et al, 2018). El cáncer de pulmón es el que predomina en incidencia (y casos de muerte por cáncer) en hombres, con 1 368 524 nuevos casos (14.5%), y en mujeres el de mama con 2 088 849 nuevos casos (24.2%) (<https://gco.iarc.fr/today/fact-shets-cancers>). La incidencia y muerte por cáncer están creciendo rápidamente a nivel mundial y se proyecta que para el 2030 habrá 22.2 millones de nuevos casos de cáncer (Ferlay J, et al, 2010).

En México se estimaron 190 667 nuevos casos de cáncer y 83 476 casos de muerte por cáncer en 2018. En hombres el primer lugar lo ocupa el cáncer de próstata con 25 049 nuevos casos. En mujeres el cáncer de mama con 27 283 nuevos casos, seguido del de tiroides y el cervico uterino (<https://gco.iarc.fr/today/fact-shets-cancers>).

CÁNCER CERVICO- UTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el 8º lugar en incidencia en la población en general a nivel mundial, aunque en algunos países, principalmente de África Sub-Sahariana, ocupa el 1º lugar en incidencia y muertes por cáncer debido a las condiciones de pobreza y el poco acceso a instituciones de salud (Bray F, et al, 2018). En mujeres ocupa el 4º lugar mundial en incidencia con un estimado de 569 847 nuevos casos en 2018 (sólo después de los tumores de mama, colorectal y de pulmón) y el mismo 4º lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres (311 000 muertes) (<https://gco.iarc.fr/today/fact-shets-cancers>).

En México en 2018 el cáncer cervicouterino ocupó el 5º lugar en incidencia en cáncer en la población en general (**Figura 2**), y el 3er. lugar en incidencia en mujeres (7 869 nuevos casos). En el mismo año se estimaron 4 121 muertes por este cáncer.

Se considera que la población femenina nacida en Latinoamérica tiene un alto riesgo para desarrollar CaCU (Sánchez-Barriga J, 2012), debido en parte a las variantes de virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo asociadas a esta población (var AA de VPH 16 y 18) localizadas principalmente en Centro y Sudamérica, además de España (Berumen J, et al, 2001), y que juegan un papel importante para la aparición del CaCU. La variante de VPH 16 encontrada en la población mexicana, característica en mujeres

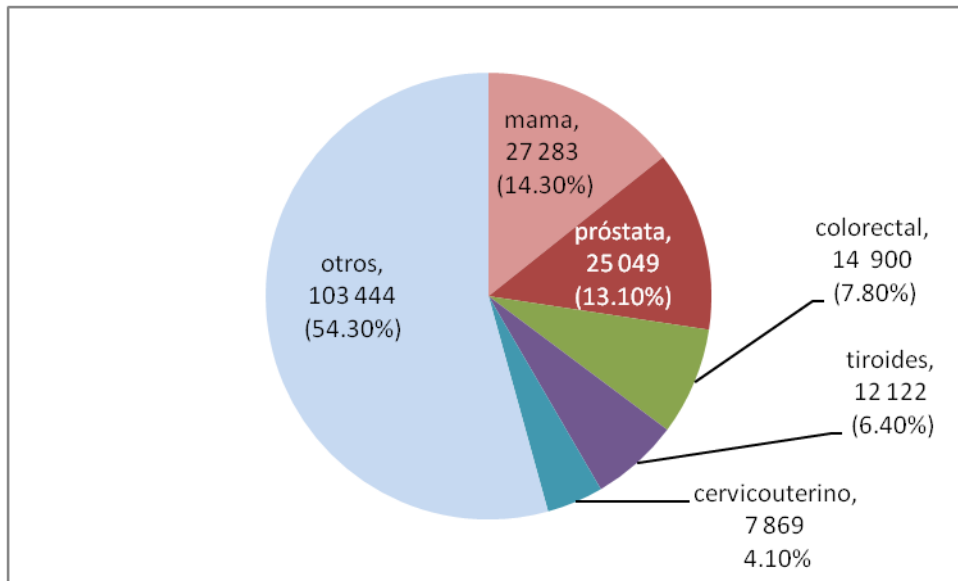


Figura 2. Estimación de la Incidencia de cáncer en México en 2018. El cáncer cervico uterino ocupa el 5º. lugar en incidencia entre los tipos de cáncer en México en la población en general en 2018. (<https://gco.iarc.fr/today/fact-shets-cancers>).

amerindias, parece representar una variante de más alto riesgo para la aparición del CaCU (Lizano M, et al, 1997). Las disparidades sociales prevalentes en México propician una elevada morbilidad y mortalidad por este tipo de cáncer (Couture M, et al, 2008). La región con la mayor fuerza de asociación con la mortalidad por CaCU en el período 2000-2008 fue la llamada región socioeconómica 1, conformada por Guerrero, Chiapas y Oaxaca (entidades con el nivel socioeconómico más bajo del país), además de los estados de Colima, Veracruz y Yucatán (Sánchez-Barriga J, 2012).

Contrario a lo que sucede en EU y Europa, donde hasta el 75% de los diagnósticos se hace en estadios clínicos tempranos, en México las etapas avanzadas localmente son las que tienen mayor prevalencia, por lo que los programas de detección oportuna con citología cervical aún no son suficientes (Dueñas-Gonzalez A, et al, 2003). El Programa de Acción Específico para la Prevención y Control de Cáncer en la Mujer (PAEPCCM) (Secretaría de Salud, 2014) propone la prevención del cáncer en 3 niveles, siendo el primer nivel el educativo. Sin embargo, las actividades de educación son mínimas e insuficientes, además de no ser idóneas pues no se busca adaptarlas a las diferentes características sociales y culturales de las

mujeres de diferentes poblaciones, y no está integrada a sus contextos, características y necesidades específicas (Dórame-López NA, et al, 2017). A pesar de que la citología vaginal (Papanicolaou) es un estudio sencillo, indoloro y de bajo costo, siendo la prueba preventiva por elección, no existe en México una cultura de prevención correcta, ya sea por desconocimiento, por que las mujeres decidan no hacerse la prueba, muchas veces por la negativa cultural de sus parejas, o por la falta de acceso a los servicios de salud (Vargas-Hernández VM, et al, 2015), e incluso por los largos tiempos de espera en las unidades de salud que desalienta a las mujeres para llevarlo a cabo (Dórame-López NA, et al, 2017).

El cáncer cervicouterino se presenta en la zona resultante de la unión de 2 epitelios: el vaginal (epitelio escamoso estratificado) y el endocervical (una capa única de epitelio columnar alto) (Sepúlveda J, 2012), que se conoce como Zona de Transformación. Dependiendo de la estirpe celular de la que se origine, el cáncer de cérvix puede ser de 3 tipos principales (Alcalá F, et al, 1999):

- Epidermoide o escamoso.
- Adenocarcinoma.
- Mixto o adenoescamoso.

Siendo muchas las causas que se asocian al desarrollo del CaCU, el Virus del Papiloma Humano parece ser el factor etiológico más importante, encontrándose genomas de los virus en la mayoría de los carcinomas cervicales (Bosch F, et al, 1995). De entre los 40 diferentes tipos que infectan el epitelio genital, el VPH 16 se ha asociado predominantemente con carcinomas de células escamosas y el VPH 18 con adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos (Bosch F, et al, 1995).

Tradicionalmente los tratamientos antitumorales se basan en el ataque masivo y no discriminado de las poblaciones celulares con alto grado proliferativo, donde los efectos primarios se traducen en una disminución de la masa tumoral, aunque en la mayoría de los casos no son suficientes para garantizar una completa curación o remisión del tumor (Silva A, s.f.). La recurrencia en la enfermedad diagnosticada en forma temprana se presenta en menos del 10% de los casos, mientras que en las pacientes con enfermedad localmente avanzada se llega a presentar en hasta el 33% de las pacientes (Montalvo E, et al,

2011). Es imprescindible entonces mejorar las terapias existentes para reducir la mortalidad de esta enfermedad.

Un modelo emergente para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales involucra la existencia dentro del tumor de una pequeña subpoblación celular, las llamadas Células Troncales Cancerosas (CSCs por sus siglas en inglés).

CÉLULAS TRONCALES

Nuestros cuerpos están constantemente regenerando sangre, piel, y gran parte de nuestros tejidos. La identidad de las células que nos permiten esta regeneración de tejidos no fue conocida sino hasta la década de los 50s del siglo pasado, cuando se estableció la existencia de Células Troncales en estudios de médula ósea, lo cual inició el desarrollo de la investigación en los trasplantes de éste tejido (The National Academies, s.f.). Durante todo el proceso de desarrollo, desde el feto hasta la edad adulta, las células troncales funcionan como un reservorio de células indiferenciadas, cuyo papel es la generación de células en una variedad de tejidos y órganos, jugando en el adulto un papel homeostático esencial, al sustituir células diferenciadas de diferentes tejidos para un recambio fisiológico o porque se han perdido por daño o enfermedad (Nombela Cano, et al, 2010). El mantenimiento de los tejidos del organismo por medio de las células troncales se ha demostrado tanto en órganos con alto ritmo de recambio como la médula ósea, colon y piel, con recambios medidos en días o semanas, como en órganos con ritmo de recambio bajo, como el cerebro (Gudjonsson T & K Magnusson, 2005). Las células troncales pueden dividirse asimétrica o simétricamente. Su división asimétrica genera 2 células: una idéntica a su célula madre conservando su característica de troncalidad, y otra comprometida a diferenciarse en nuevos linajes celulares. Estas últimas, llamadas células progenitoras, continúan dividiéndose y originan finalmente células diferenciadas (Schwarz A & J Melendez, 2011).

Dependiendo de su origen se reconocen generalmente 2 tipos de células troncales:

- CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS
- CÉLULAS TRONCALES SOMÁTICAS (ADULTAS)

Algunos autores incluyen un tercer tipo, las Células Troncales Germinales (Arely L, 1974), que producen óvulos y espermatozoides.

Las **Células Troncales Embrionarias** se derivan de la masa interna de células contenida en el blastocisto (esfera hueca de células que se desarrolla 5 días después de la fertilización de un óvulo por un espermatozoide). Esta masa contiene todo el material necesario para el desarrollo de un organismo humano completo (The National Academies, s.f.), exceptuando los tejidos extra-embrionarios (placenta, saco vitelino y cordón umbilical). La progenie de las células Troncales Embrionarias es la precursora de todas las células del organismo adulto. Las **Células Troncales Somáticas** producen células que se diferencian a células funcionales maduras y llevan a cabo entonces la renovación normal de los tejidos (Gudjonsson T & K Magnusson, 2005).

La habilidad de una célula Troncal que le permite producir progenie capaz de expresar varios fenotipos maduros es llamada "Potencial" o "Plasticidad" (Sell S, 2004). De acuerdo a su potencial de desarrollo, las células Troncales se clasifican en 5 grupos (Jaenisch R & R Young, 2008):

- **TOTIPOTENCIALES:** Capaces de generar un organismo completo, incluyendo a las estructuras que no formarán parte de él (tejidos extra-embrionarios). En los mamíferos sólo el cigoto y los blastómeros tempranos, hasta el estadio de mórula de 8 células (Mayani H, 2011), son totipotentes.
- **PLURIPOTENCIALES:** Que pueden auto-renovarse y generar todos los tipos celulares del cuerpo, pero no el linaje trofoblástico extra-embrionario. Tal es el caso de las células Troncales Embrionarias.
- **MULTIPOTENCIALES:** Pueden originar múltiples tipos celulares de un linaje, como las Células Troncales Hematopoyéticas. Son las células Troncales Adultas.

- **UNIPOTENCIALES:** Originan células de un solo tipo. Es el caso de las células Troncales epidermales y las Espermatogoniales del testículo (Preston SL, et al, 2003) que originan el esperma.
- **REPROGRAMADAS:** Artificialmente se pueden reprogramar células Troncales Adultas hacia células pluripotentes en estado embrional. También se les conoce como Células Pluripotentes Inducidas (IPS).

Las células troncales conforman poblaciones numéricamente reducidas de células (Chávez-González M & Moreno-Lorenzana D, 2011). Una Célula Troncal se caracteriza por 3 propiedades distintivas (Craig T, et al, 2006; Chávez-González M & Moreno-Lorenzana D, 2011) que la hacen única, y que conservan a lo largo de la vida del organismo (Gudjonsson T & K Magnusson, 2005):

1. Capacidad de Auto-renovarse.
2. Capacidad de generar múltiples linajes celulares.
3. Potencial de proliferar extensamente.

Teorías recientes sugieren que una pequeña población de células dentro de un tumor posee la habilidad de auto-renovación y proliferación y es, por tanto, capaz de mantener el tumor. La evidencia parece sugerir que los tejidos cancerosos podrían contener sus propias células troncales (Kondo T, et al, 2004). Estas células han sido llamadas Células Troncales Cancerosas (Cancer Stem Cells – CSCs) o Células Iniciadoras del Tumor (Tumor-Initiating Cells - TICs), aunque estos 2 términos podrían referirse a poblaciones celulares distintas (Silva A, s.f.).

CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

La hipótesis de que el cáncer puede originarse de una población de células con propiedades de células troncales fue propuesta hace casi 150 años. Julius Conheim, médico alemán nacido en 1839 e interesado en las causas y desarrollo de los tumores así como en el problema de metástasis, propuso en

1875 que los tumores no derivaban de tejidos adultos normales, sino de “células embrionarias que habían permanecido (producidas en exceso durante el desarrollo embrionario)” (Fresquet J, s.f.). Conheim notó el parecido entre las células tumorales y las embrionarias, ambas con capacidad de extenderse. Las células embrionarias producidas en exceso podrían persistir durante mucho tiempo a lo largo de la vida del sujeto, y una activación anormal del crecimiento de estas células sería la génesis de un tumor.

Las células troncales normales y las células cancerosas comparten muchas propiedades, entre ellas un tiempo de vida largo (Chávez-González M & Moreno-Lorenzana D, 2011), además de las siguientes (Wicha M, et al, 2006; Kucia M & MZ Ratajczak, 2006):

- a) Su capacidad de auto-renovación.
- b) La habilidad de diferenciarse.
- c) La expresión de Telomerasa Activa.
- d) La activación de vías anti-apoptóticas.
- e) El aumento de la actividad transportadora de membrana, que les confiere resistencia a drogas y toxinas.
- f) La habilidad para circular de las células troncales y la capacidad de llevar a cabo metástasis en las células cancerosas involucra procesos similares.

La idea de las CSC se desarrolló de la observación de que existen similitudes entre los mecanismos de auto-renovación de las células troncales y de las células cancerosas y, de manera importante, de la observación de su capacidad de reproducir el tumor cuando son trasplantadas en ratones inmunocomprometidos (Turdo A, et al, 2019). Se han identificado fracciones muy pequeñas de poblaciones biológicamente distintas de células Iniciadoras del Tumor (TICs) en cánceres del sistema hematopoyético (Lapidot T, 1994), de cerebro (Singh S, 2004) y de mama (Al-Hajj M, 2003), entre otros. Las propiedades de estas células son muy parecidas a las propiedades de las células troncales normales. Las células malignas con estas propiedades funcionales se han nombrado Células Troncales Cancerosas (Craig T, et al, 2006).

Muchos tumores parecen contener sus propias células troncales y parecen estar formados por una organización jerárquica de células que incluyen células troncales de lenta división, células precursoras

de rápida división, y células diferenciadas (Kondo T, et al, 2004). La presencia de una pequeña sub-población de células troncales de lenta división podría explicar por qué muchos tumores recurren después del tratamiento con radiaciones o drogas citotóxicas, aun cuando la mayoría de las células parecen morir con los tratamientos. Usualmente algunas células sobreviven al tratamiento y éstas podrían ser las células troncales cancerosas, esenciales para la malignidad del cáncer. Hay entonces evidencias para soportar la idea de que el cáncer humano podría ser una enfermedad donde el crecimiento celular anormal es dirigido por un pequeño “pool” de células troncales patológicas que, además de crecimiento incontrolado y capacidad para formar metástasis, poseen características de auto-renovación y de diferenciación hacia una progenie fenotípicamente heterogénea (Dalerba P, et al, 2007), y que además son parcialmente responsables de recurrencia y progresión tumorales (Toledo-Guzmán, et al, 2018). Lapidot T. y cols. (1994) fueron los primeros en identificar CSC al trasplantar células de leucemia mieloide aguda a ratones SCID (con inmunodeficiencia combinada severa), llamándolas células iniciadoras de leucemia aguda (AML-ICs), cuyo fenotipo era CD34+ CD38-. Más tarde, Bonnet y Dick (1997) usaron ratones NOD/SCID (diabéticos no obesos/SCID) para probar que solo una pequeña población de células de leucemia aguda mieloide (CD34+ CD38-) era capaz de iniciar un cáncer hematopoyético en ellos.

Sin embargo, parece que no todos los tipos de cáncer siguen esta organización jerárquica de células, donde existe una pequeña sub-población de células troncales que dirige y mantiene el tumor, y una población mayor de células no tumorigénicas. En estudios recientes se ha encontrado que existen diferentes poblaciones celulares dentro de un mismo melanoma, fenotípicamente distintas, con capacidad tumorigénica, y en donde no se logra identificar alguna sub-población grande que no muestre esta capacidad y, de acuerdo a los autores, la variedad fenotípica con capacidad tumorigénica que encontraron en melanoma podría explicarse por una plasticidad fenotípica celular, en donde ciertos atributos funcionales de las células tumorigénicas pudieran reversiblemente encenderse y apagarse (Quintana E, et al, 2010). Otros estudios en linfomas y leucemias muestran que el porcentaje de células

del tumor con características de CSC no siempre es un pequeño “pool”, y que hasta 10% o más de la población celular puede ser responsable de mantener el tumor, sugiriendo que estas células bien podrían mejor llamarse “células propagadoras del tumor” (Kelly PN, et al, 2007). Los autores del estudio señalan que el pequeño porcentaje de células iniciadoras del tumor encontrado en otros estudios podría más bien solo reflejar el porcentaje de células que pudieron adaptarse a crecer en los ratones trasplantados de esos estudios. El modelo de CSC del cáncer, que nos habla de una pequeña sub-población de células cancerosas (CSC) con la habilidad exclusiva de auto-renovación y mantenimiento del tumor puede entonces presentar variaciones dependiendo del tipo de tumor, y de su estado de progresión maligna, además de los microambientes estromales, e incluso del tipo celular de origen, y podría verse como una condición celular de plasticidad de al menos 2 estados fenotípicos alternativos, independientemente de sus proporciones, con una interconversión bidireccional entre las poblaciones de CSC y no CSC, que mantienen sus identidades fenotípicas y funcionales particulares en cualquier momento dentro de la población celular del tumor (Gupta P, et al, 2009).

El origen de las células troncales cancerosas es desconocido, pero se manejan 2 hipótesis:

a) Se originan de una célula troncal que sufre una transformación.

Es razonable asumir que las células troncales, con habilidad intrínseca de auto-renovación, sean los blancos más probables para la transformación. El hecho de que la mayoría de las células troncales cancerosas poseen marcadores de superficie semejantes a los de su contraparte normal pareciera apoyar la hipótesis de este origen de las CSC (Gudjonsson T & K Magnusson, 2005). También sus similitudes funcionales con las células troncales normales podrían bien hacernos pensar que derivan de una célula troncal mutada (Malanchi I & J Huelsken, 2008). La desregulación en la capacidad de auto-renovación de estas células parece ser el primer paso en su transformación (Wicha M, et al, 2006). Su característica larga vida les da la posibilidad de acumular múltiples cambios genéticos y epigenéticos, que se requieren para la carcinogénesis, transformándolas completamente. El tumor puede entonces presentarse hasta 20 a 30

años después, tal como sucedió con las mujeres que desarrollaron cáncer de mama después de su exposición a radiación por las bombas de Hiroshima y Nagasaki (Wicha M, et al, 2006). También existe la hipótesis de que la célula troncal cancerosa se origina por que la célula troncal pierde su propiedad de división asimétrica. Una célula troncal se divide asimétricamente, y se origina entonces una nueva célula troncal semejante a la madre (Wodarz A & C Gonzalez, 2006), por un lado, y por otro una célula que pasará a diferenciarse en células del tejido propio. Estas últimas se conocen como células progenitoras y son las mayores contribuyentes a la renovación del tejido normal. Si se pierde la división asimétrica entonces las 2 células hijas serán idénticas a la célula madre, causándose una acumulación de células troncales que conduce a su comportamiento maligno (Clevers H, 2005). El microambiente que rodea a una célula, llamado nicho, también podría jugar un papel importante en el desarrollo de una célula troncal cancerosa. Se ha encontrado que células troncales de médula ósea que se encuentran en otros tejidos pueden desarrollar un proceso neoplásico en un contexto de inflamación crónica (Houghton J, et al, 2004). El que la célula se encuentre fuera de su nicho normal puede facilitar su descontrol al desaparecer las señales inhibitorias de la matriz extracelular.

- b) Se originan de una célula progenitora, o incluso de una célula diferenciada,** que por procesos de desdiferenciación adquiere propiedades de célula troncal con comportamiento maligno.

Algunas líneas de investigación indican que las células troncales cancerosas se desarrollan a partir de células progenitoras mutadas (Craig T, et al, 2006). Se ha visto que ciertas leucemias derivan de células progenitoras comprometidas que reactivan su programa de auto-renovación (Krivstov A, et al, 2006). Inclusive, en un modelo de cáncer gástrico generado de manera experimental, se encontró que la célula progenitora que lo originó fue una célula troncal derivada de médula ósea (Houghton J, et al, 2004). Se ha propuesto incluso que hay diferencias en fenotipos moleculares y clínicos en cáncer de mama, dependiendo de si se originan de la transformación de células troncales o si se originan de células

progenitoras tempranas (Wicha M, et al, 2006). También se ha postulado que una célula ya diferenciada puede des-diferenciarse y adquirir características de troncalidad.

Las células troncales cancerosas mantienen el crecimiento a largo plazo del tumor, generando diversas células de la masa tumoral y, al mismo tiempo, llevando a cabo su propia auto-renovación (Malanchi I & J Huelsken, 2008). La diferencia entre las CSC y las otras células del tumor podría ser incluso epigenética (Kondo T, et al, 2004), y se ha visto que algunos marcadores de CSC e incluso vías de señalización involucradas en el cáncer son regulados por modificaciones epigenéticas (Turdo A, et al, 2019) . No obstante, no se sabe con certeza si las CSC iniciadoras del tumor son las mismas que las células encargadas de mantener y crecer el tumor (Silva A, s.f.).

Experimentalmente, las células troncales cancerosas se definen como células derivadas del tumor que son capaces de regenerar un tumor después de trasplantarlas (Malanchi I & J Huelsken, 2008). La cantidad de células troncales cancerosas iniciadoras de tumor que se ha encontrado en diferentes tumores es variable. En leucemias mieloides agudas se ha encontrado que constituyen 0.0001 a 0.0006 % del tumor, en tanto que en otros tipos de leucemia pueden representar hasta el 10 %. Las células troncales hematopoyéticas leucémicas se encuentran en la médula ósea, al igual que las troncales hematopoyéticas normales, pero en números mucho mas grandes (Chavez-Gonzalez M, et al, 2009). Los tumores sólidos a menudo contienen proporciones mayores de células iniciadoras del tumor. En glioblastomas agresivos se ha encontrado hasta el 29 % de éstas CSC (Singh S, et al, 2004), y en cáncer de mama se ha reportado hasta un 35 % de abundancia (Al-Hajj M, et al, 2003).

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES

Para que una célula normal o cancerosa sea reconocida como célula troncal es necesario demostrar sus propiedades de auto-renovación y también que pueden reconstituir los tejidos normales y cancerosos, respectivamente, durante un período de tiempo extenso (Gudjonsson T & K Magnusson, 2005).

En 1961 Till JE & EA McCulloch mostraron que la médula ósea adulta contenía células “maestras” que podían generar todos los tipos celulares sanguíneos (Till JE & EA McCulloch, 1961), y en 1963 se reveló la existencia de células troncales de médula ósea y la naturaleza clonal de colonias celulares derivadas de células transplantadas de médula de ratón (Becker AJ, et al, 1963). Se sabe que las células troncales se encuentran localizadas en una zona profunda de un tejido y se presentan sólo en números pequeños (Understanding Stem cells, s.f.). Las células troncales no poseen características morfológicas que las distinguan de las otras células del tejido en donde se encuentran (Mayani H, 2011).

Una manera de identificar y aislar células troncales es por su perfil inmunofenotípico o marcadores de superficie característicos (Schwarz A & J Meléndez, 2011). Lapidot y cols. (1994) identificaron por primera vez células iniciadoras de Leucemia Mieloide Aguda usando sus marcadores de superficie. De este modo se identifican, entre otras, células troncales cancerosas hematopoyéticas que expresan CD34+ y CD38- y neurales que expresan CD133+ (tabla 1).

TIPO DE CANCER	FENOTIPO	Referencia
Leucemia Mieloide Aguda	CD34+ CD38-	Lapidot T et al, 1994
Mama	CD44+ CD24- Lin-	Al-Hajj M et al, 2003
Cerebro	CD133+	Singh S et al, 2004
Colon	CD133+	O'Brien CA et al, 2007
Próstata	CD44+ α 2 β 1 CD133+	Collins et al, 2005
Hígado	CD90+ CD44+ CD49f+	Yang ZF et al, 2008; Rountree CB et al, 2008
Pulmón	CD133+ EpCAM+	Eramo et al, 2008
Cérvix	CD44+ CD24+	Liu H et al, 2016

Tabla 1. Marcadores de superficie de células troncales cancerosas de diferentes tumores.

Otra manera de aislar y analizar las células troncales es usando la propiedad que les confieren los transportadores de membrana ABC (ATP-Binding Cassette), que les permite bombear al exterior moléculas tales como drogas citotóxicas y tinciones (Chen K, et al, 2013). La mayoría de las células acumulan tinciones fluorescentes como el Hoechst 33342, pero las células troncales no lo hacen, de

manera que éstas se pueden seleccionar de entre las que contienen un bajo nivel de ésta tinción (Schwartz A y J Meléndez, 2011).

Una tercera manera de aislarlas es el uso de sistemas de cultivo en esferas usados para enriquecer las CSC in vitro, y en donde la propagación clonal de células individuales en un sustrato no adherente permite la formación de estructuras en flotación. Los cultivos en esfera fueron usados por primera vez para estudiar Células Troncales Neurales y fueron los primeros sistemas in vitro en los que se demostró sin lugar a dudas la presencia de células troncales en cerebro de adulto (Reynolds BA & S Weiss, 1996), estableciéndose que éstas esferas neurales derivan de la expansión clonal de una sólo célula troncal neural (Singh S, et al, 2004). El método se estableció después en un modelo de cáncer de cerebro (Sing S, et al, 2003), y de ahí se han establecido en diferentes tumores sólidos, como en cáncer de mama (Ponti D, et al, 2005) y de colon (Ricci-Vitiani L, et al, 2007), entre otros. También se han establecido sistemas de esferas en líneas celulares de CaCU (cervo-esferas) en donde se observa un enriquecimiento de CSC, con un fenotipo característico (CD49f⁺, Aii⁺, CK-17⁺, p63⁺, ALDH^{bright}) (Ortiz-Sánchez E, et al, 2016).

Lapidot y cols. (1994) probaron la efectividad de las CSC que identificaron y aislaron por su perfil inmunofenotípico para formar tumores después de inyectarlas en ratones SCID, mientras que otras poblaciones celulares del mismo tumor no lo hacían. Desde entonces, este ensayo funcional ha permitido la identificación de CSC en muchos tipos de tumor (Schwartz A y J Meléndez, 2011).

Se han hecho observaciones experimentales clave en torno a las CSC (Schwartz A y J Meléndez, 2011). Entre ellas están:

1. Se auto-renuevan y proliferan.
2. Generan clusters de células clonalmente derivadas que semejan esferas.
3. Las células cancerosas tumorigénicas se caracterizan por un perfil de marcadores de superficie específicos y pueden ser aisladas por citometría de flujo u otros métodos inmunoselectivos.
4. La masa tumoral derivada de células tumorigénicas contiene una mezcla de células cancerosas tumorigénicas y no tumorigénicas, recreando una población fenotípicamente heterogénea.

La prueba clave para definir la troncalidad de las células cancerosas es su habilidad para generar una fenocopia de la malignidad original en ratones inmunocomprometidos.

Diversas vías de señalización que regulan los procesos de división, diferenciación y apoptosis se encuentran alteradas en las células cancerosas y, de manera importante, en las Células Troncales Cancerosas. Entre ellas se encuentran las vías Wnt/bcatenina, PTEN, TGF-B, Hedgehog, Notch y Bmi-1.

VIA Wnt/ β -catenina

La señalización de la vía Wnt está implicada en una amplia variedad de procesos celulares, entre ellos: proliferación, polaridad y determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis adulta (Logan C & R Nusse, 2004). Por ejemplo, las células que recubren el epitelio del colon proliferan en un balance perfecto en relación a las células que mueren. Si la vía está aberrantemente encendida puede aparecer cáncer de colon (Peifer M & P Polakis, 2000). También se reconoce la influencia de la vía en procesos de migración, adhesión celular, arquitectura tisular, organogénesis (Peifer M & P Polakis, 2000; Wodarz & Nusse, 1998), así como en apoptosis y sobrevivencia (Willert K & K Jones, 2006). De esta manera, procesos como la hematopoyesis, osteogenesis, angiogenesis y adipogenesis (Ross S, et al, 2000; Goodwin A & P D'Amore, 2002; Gong Y, et al, 2001) tienen relación con esta vía de señalización.

El nombre de Wnt viene de una combinación de "*Wingless*", un gen de *Drosophila*, y el nombre de su homólogo en vertebrados, "*int-1*" (Komiya Y & R Habas, 2008). El ligando extracelular Wnt estimula varias cascadas de señalización intracelulares, entre las cuales está la **vía Wnt/ β -catenina**, también conocida como **vía Canónica** que es dependiente de β -catenina, y la **vía no Canónica**, independiente de β -catenina. Esta última a su vez dividida en 2: la **vía de la Polaridad Celular Plana**, y la **vía Wnt/ Ca^{2+}** .

La familia Wnt de glucoproteínas en el ser humano consiste de 19 miembros conocidos que tienen un patrón conservado de 23-24 residuos de cisteínas (Camilli T & A Weeraratna, 2010). Antes de ser secretadas sufren una modificación en el retículo endoplásmico, donde la acetil transferasa Porcupina le adiciona el lípido ácido Palmitoléico (Willert K, et al, 2003), y posteriormente se unen a la proteína transmembrana Evi/Wls en el aparato de Golgi (Bartscherer K, et al, 2006; Bänziger C, et al, 2006) y parecen ser transportadas de ahí a través de endosomas. Su salida al exterior podría estar facilitada por vesículas exocíticas (Gross JC, et al, 2012), por partículas lipoprotéicas (Neumann S, et al, 2009) o por simple solubilización en la membrana (Mulligan KA, et al, 2012). Ya en el exterior, Wnt se separa de Wls y puede ejercer su función de ligando (Nusse R & H Clevers, 2017) **(Figura 3)**.

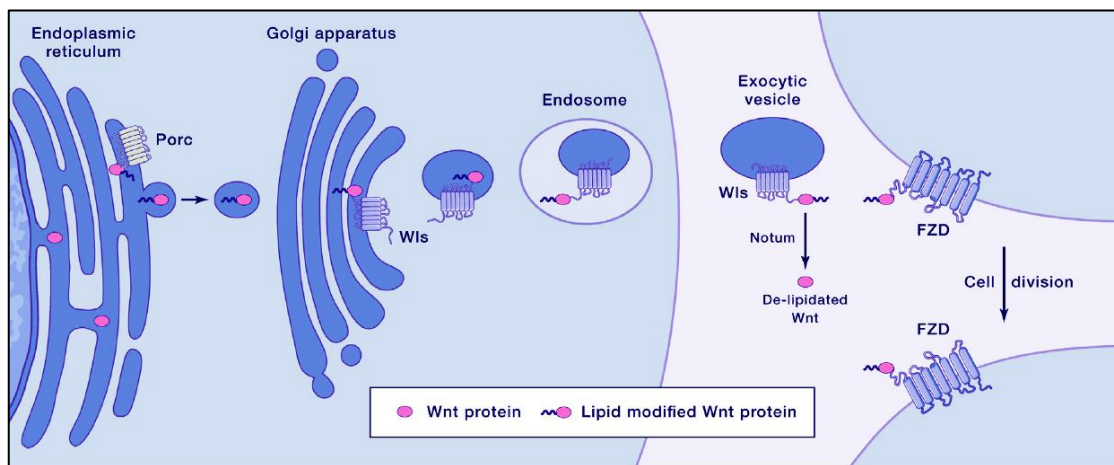


Figura 3. Modelo de Secreción de Wnt. Wnt se une a un lípido en el Retículo Endoplásmico, y luego se une a la proteína Evi/Wls en el Aparato de Golgi. Se transporta a la membrana celular por medio de un endosoma y finalmente sale al exterior por medio de una vesícula exocítica. (figura tomada de Nusse R & H Clevers, 2017).

Vía Canónica Wnt/ β -catenina

La β -catenina es una proteína de 728 aminoácidos (92 kDa), y tiene funciones variadas que dependen de su localización celular, y su interacción con otras proteínas, ya sea en la membrana celular formando parte de un complejo de adhesión celular, y/o en citoplasma y núcleo, con funciones de transducción de señales. En la membrana forma un complejo de adhesión celular junto con la molécula E-cadherina que previene la disociación celular (y su posible migración) (Gonzalez-Moles M, et al, 2014). La

selección de la función que β -catenina cumpla depende de factores variados. Conforme β -catenina es sintetizada, es ensamblada en los complejos de adhesión y la que se encuentre en citoplasma es capturada y destruida por el llamado complejo de destrucción (Harris T & M Peifer, 2005). La fosforilación de β -catenina en la tirosina 645 interrumpe este complejo de adhesión, favoreciendo migración e invasión celular (Gonzalez-Moles M, et al, 2014).

En la vía canónica, la proteína β -catenina es el principal efector y media la transmisión de la señal de Wnt al núcleo y la subsecuente activación de genes blanco. Aunque algunas partes del proceso de señalización están relativamente claras, la totalidad del mismo aún nos reserva muchas incógnitas.

Vía canónica Wnt/ β -catenina inactiva

En condiciones fisiológicas, la vía canónica Wnt/ β -catenina se mantiene inactiva la mayor parte del tiempo y la proteína β -catenina es constitutivamente degradada (Mohammed M, et al, 2016). La proteína β -catenina se mantiene en niveles citoplásmicos bajos debido a la acción de un grupo de proteínas llamado “Complejo de Destrucción de β -catenina” (Xing Y, et al, 2003), y que se mantiene ensamblado gracias a la acción de andamio de **Axina** que, sin embargo, es el elemento menos abundante del complejo, por lo que la cantidad de complejos de destrucción en una célula podría depender de la cantidad de axinas presente (Lee E, et al, 2003). Las proteínas esenciales del complejo son, además de la axina, la proteína supresora del tumor **APC** - adenomatous polyposis coli (mutada en más del 80% de los cánceres de colon (Kimelman D & W Hu, 2006))- , las cinasas de serina-treonina constitutivamente activas **Gsk3 β** (glucogeno sintetasa cinasa) y **Ck1** (caseína cinasa 1) y la proteína F-box **β -TrCP** de un complejo de ubiquitina ligasa. La fosfatasa **PP2A** también suele estar asociada en el complejo, cumpliendo quizá un papel regulatorio. El ensamblaje de todas estas proteínas permite la cercanía de *β -catenina* con las cinasas arriba mencionadas, que la fosforilan secuencialmente. *Ck1* fosforila a *β -catenina* en el residuo Ser45 y posteriormente *Gsk3 β* la fosforila en los residuos Thr41, Ser37 y Ser33 (Liu C, et al, 2002), donde

la fosforilación de cada residuo ceba la siguiente fosforilación. Estos sitios de fosforilación crean de manera conjunta un sitio de unión para la proteína β -TrCP, que forma parte de un complejo de ubiquitina ligasa. β -TrCP reconoce los residuos Ser37 y Ser33 (Wu G, et al, 2003) de β -catenina, la cual es ubiquitinada y marcada así para su degradación proteosomal (**Figura 4**).

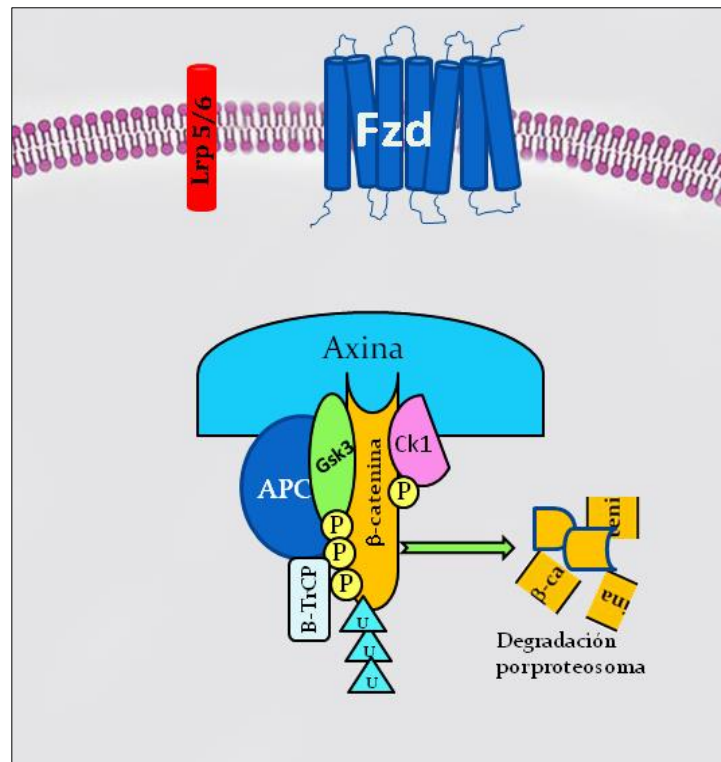


Figura 4. Vía canónica Wnt/ β -catenina inactiva. Cuando la vía canónica está inactiva el complejo de destrucción se encarga de mantener b-catenina en niveles bajos, destruyéndola vía proteosoma.

Vía canónica Wnt/ β -catenina activa.

Cuando la vía está activa, la unión de Wnt a sus receptores induce la inactivación del complejo de destrucción de una manera que aún no es clara y como consecuencia hay una acumulación de β -catenina, que se trasloca al núcleo y se une a proteínas de unión al ADN de la familia Tcf/LEF. El complejo β -catenina/Lef interacciona con una secuencia específica en la región promotora dando por resultado activación transcripcional génica de genes de respuesta a Wnt. La fosforilación de β -catenina es así el paso regulatorio central de la vía canónica Wnt/ β -catenina (Xing Y, et al, 2003).

Cómo se inactiva el complejo de destrucción ante la presencia del ligando Wnt es aún un asunto controversial. Algunos autores sugieren que la destrucción de Axina 1 es la causa inmediata de estabilización de β -catenina en la célula ante la presencia de Wnt (Mao J, et al, 2001).

El paso inicial en la activación de la vía es la unión de Wnt a un complejo de 2 moléculas: por un lado al receptor **Frizzled** (Fzd), molécula de 7 dominios transmembranales, y por otro el correceptor **Lrp5/6** que atraviesa la membrana una sola vez. El dominio N-terminal rico en cisteínas de Fzd es el dominio principal de unión a Wnt (Hsieh J, et al, 1999). Cuando se une Wnt los receptores Fzd y Lrp5/6 actúan conjuntamente formando un dímero. Se sabe que como resultado de esta unión la cola citoplásmica de Lrp es fosforilada, al menos parcialmente por Gsk3, y probablemente también por Ck1. El mecanismo subsecuente no está del todo claro y hay varias propuestas. La fosforilación permite que se reclute la Axina del complejo de destrucción a la membrana plasmática. Parece ser que la parte citoplásmica de Fzd une la proteína **Dishevelled** (Dvl) (Tauriello D, et al, 2012) que entonces se polimeriza y se activa (Metcalf C, et al, 2010) y ello facilita la unión de la axina (**Figura 5**). Esto desorganiza el complejo de destrucción, o lo inactiva funcionalmente (Li V, et al, 2012). Algunos estudios sugieren la inactivación de Gsk3 cuando Wnt está presente, bloqueándose así la fosforilación de más β -catenina. Hatsell S y cols. (2003) sugieren que la inactivación se lleve a cabo por Dvl activada, mientras que Stamos J y cols. (2014) sugieren que sea el receptor Lrp fosforilado que inactiva la cinasa.

¿Qué pasa con el complejo de destrucción ante la presencia de Wnt?

El complejo de destrucción deja de llevar a cabo la destrucción de β -catenina, pero no está claro el mecanismo para ello. Podría ser desensamblado como respuesta a desfosforilación de Axina gracias a la acción de las fosfatasa PP1 y PP2A (Luo W, et al, 2007; Strovel E, et al, 2000). Sin embargo, Li V y cols. (2012) proponen otro modelo: sus resultados muestran que el complejo de destrucción no se desensambla y desorganiza, y que Gsk3 tampoco se inactiva. Según sus investigaciones, β -catenina se

sigue fosforilando aun en presencia de Wnt, y llega a saturar a los complejos de destrucción con β -catenina fosforilada, pues β -TrCP se disocia del complejo ante la presencia de Wnt y entonces no se destruye mas β -catenina (Figura 5). La saturación de los complejos de destrucción imposibilita su funcionamiento como maquinaria de destrucción de β -catenina. Ellos sugieren que la β -catenina que ahora se trasloca al núcleo es la que se produce de nuevo.

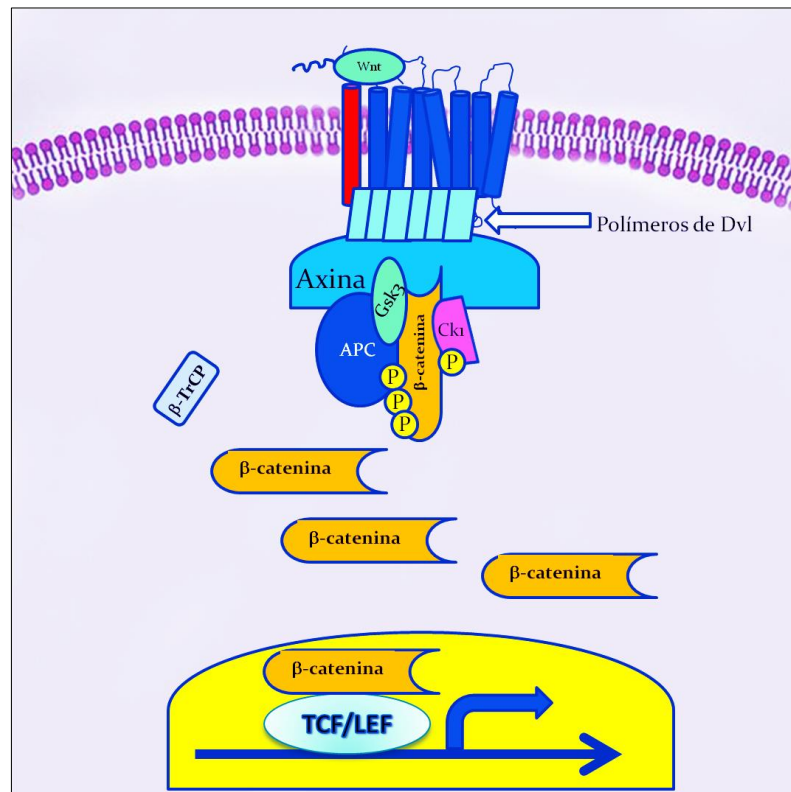


Figura 5. Cuando la vía canónica Wnt/ β -catenina está activa en presencia de Wnt, β -catenina se trasloca al núcleo. β -catenina no se destruye mas por el complejo de destrucción y entonces puede traslocarse al núcleo, donde activa genes blancos al formar un complejo activo con las proteínas TCF/LEF activando la transcripción de genes blanco.

La vía Wnt es un proceso complejo y crítico para el desarrollo y se le ha implicado en un gran número de enfermedades, entre ellas el cáncer. Su implicación en el cáncer se describió por primera vez hace poco más de 3 décadas en cáncer de mama en ratones y en cáncer de colon humano y de ratón (Anastas J & R Moon, 2013). Mutaciones que hacen a β -catenina refractaria a la destrucción se encuentran en una variedad de tumores humanos. Los sitios de fosforilación de GSK3 β en β -catenina

están mutados en algunos tipos de tumores, y estas mutaciones estabilizan β -catenina. β -catenina se une a β -TrCP sólo cuando ha sido fosforilada por GSK3 β , y los mutantes oncogénicos que carecen de sitios de fosforilación para GSK3 β no se unen a β -TrCP (Peifer M & P Polakis, 2000). Se ha demostrado la activación aberrante de la vía Wnt en tumores humanos diversos, entre ellos el de melanoma (Rubinfeld B, et al, 1997), el gástrico (Nojima M, et al, 2007) y el colorectal (Segditsas S & I Tomlinson, 2006). Un gran número de tumores esporádicos presentan mutaciones en APC o CTNNB1, y ocasionalmente mutaciones en AXINA u otros componentes de la vía (Giles R, et al, 2003).

La vía Wnt/ β -catenina está involucrada en la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT), que es un proceso de desarrollo embrionario en donde las células epiteliales adquieren propiedades tipo fibroblasto. Además de ser un mecanismo fisiológico para el desarrollo y remodelación tisular, se le considera un mecanismo patológico en la progresión de enfermedades como la fibrosis y el cáncer (Kaluri R & RA Weinberg, 2009; Thiery JP, et al, 2009). Esta vía también aumenta la habilidad para formar tumor-esferas en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas (Mani S, et al, 2008). La activación de las vías de β -catenina y Akt se requieren para mantener las características de CSCs generadas por EMT en líneas celulares de cáncer de mama y de cérvix (Li J & B Zhou, 2011). El incremento en la β -catenina citoplásmica y nuclear resulta tanto de la liberación de la β -catenina unida a membrana como de la inhibición de su fosforilación y destrucción. También la activación de la vía β -catenina resulta en una mayor activación de CD44 y por tanto en la expansión de células CD44+, características de células troncales de cáncer de mama (Li J & B Zhou, 2011).

En **cáncer de colon** la vía Wnt desregulada es una de las anormalidades más tempranas y está presente en la mayoría de estos cánceres (Vermeulen L, et al, 2010). Se ha observado que solo células con alta actividad de Wnt en estos tumores exhiben propiedades de células troncales. La fosforilación de β -catenina en la serina 522 se ha asociado con su estabilización y su consecuente traslocación al núcleo (Vermeulen L, et al, 2010). Mas del 90% del **cáncer colorectal** presenta mutaciones activadoras de la vía

Wnt (Giles R, et al, 2003). En la mayoría de estos cánceres se ha encontrado inactivada APC, y esto promueve activación de la vía (Peifer M & P Polakis, 2000). Hasta el 85% de todos los cánceres colorectales esporádicos tienen mutaciones en APC, en tanto que el 10% de los cánceres colorectales restantes presentan mutación en el gene CTNNB1, que codifica para β -catenina (Giles R, et al, 2003). La mayoría de las mutaciones del gen de β -catenina se presentan en o alrededor del exón 3, afectando los sitios putativos de fosforilación por GSK3 (Giles R, et al, 2003).

Alrededor de 33-67% de los **hepatocarcinomas** tienen acumulación de β -catenina en citoplasma y núcleo de las células, contrario a lo observado en tejidos normales, que no tienen esta acumulación. Niveles elevados de la proteína Wnt-1 se han señalado como indicador pronóstico de recurrencia de Hepatocarcinomas después de una resección quirúrgica. Wnt-1 se identifica como un factor de sobrevivencia de las células del hepatocarcinoma (Wei W, et al, 2009). Satoh y cols. (2000) encontraron mutaciones en CTNNB1 en 15/106 hepatocarcinomas afectando sitios de fosforilación y en 8 de los 91 tumores restantes se encontraron mutaciones inactivadoras en AXIN1.

Se ha demostrado que la vía Wnt/ β -catenina está frecuentemente activada en **osteosarcomas** humanos, que es la forma más común de malignidad primaria de hueso, encontrándose desregulada en aproximadamente el 70% de éste tipo de cáncer (Haydon R, et al, 2002). La expresión de DKK1 (un inhibidor de la vía) en osteoblastos afecta las células troncales hematopoyéticas (Fleming H, et al, 2008).

Se ha visto también activación de la vía en **cáncer de pulmón** de células no pequeñas (Uematsu K, et al, 2003) y se ha observado que las células troncales bronquialveolares del pulmón se multiplican en respuesta a la activación de la vía (Zhang Y, et al, 2008).

La sobreexpresión de ligandos Wnt ha sido reportada en **leucemias linfoides y mielomas múltiples** (Derksen P, et al, 2004; McWhirter J, et al, 1999).

El **carcinoma de células escamosas cutáneas** contiene CSCs que dependen de la señalización de β -catenina para mantener su troncalidad (Malanchi I, et al, 2008). Mutaciones en CTNNB1 y APC están presentes en aproximadamente 5% de todos los melanomas (Giles R, et al, 2003).

La pérdida de expresión de β -catenina anclada a membrana es un evento oncogénico temprano en la carcinogénesis de **displasias orales** (Lo Muzio L, et al, 2009). Esto se ha observado en 50% de carcinomas orales (Ishida K, et al, 2007) y se relaciona con un peor grado histológico (Laxmidevi L, et al, 2011). Algunos reportes sugieren que la activación de la vía Wnt se presenta en estados tempranos de la carcinogénesis oral, aunque se han encontrado pocos casos de mutaciones en los genes de β -catenina, APC y axina (Gonzalez-Moles M, et al, 2014). La activación aberrante de la vía podría deberse entonces a cambios epigenéticos (Gonzalez-Moles M, et al, 2014).

En **Cáncer Cérvico Uterino (CaCU)** existen pocos estudios en relación a la activación de la vía Wnt, aunque se han observado pocas mutaciones en el gen CTNNB1. Shinohara y cols. encontraron un incremento en la expresión de β -catenina en 73% de casos de CaCU, con tinción citoplásmica y nuclear positiva (Shinohara A, 2001). Se ha sugerido que algunos reguladores negativos de la vía Wnt/ β -catenina puedan estar inactivados por metilación durante la carcinogénesis cervical (Oates N, et al, 2006; Yang H, et al, 2006; Lee J, et al, 2008). También se ha observado sobreexpresión de activadores de la vía como WNT-10B (ligando) (Kirikoshi H & M Katoh, 2002), FZD10 (receptor Frizzled) (Koike J, et al, 1999) y DVL-1 (disheveled) (Okino K, et al, 2003) en líneas celulares de CaCU. Perez-Plascencia afirma que la desregulación en genes específicos que pertenecen a la vía en cuestión podría jugar un papel importante en la carcinogénesis cervical (Pérez-Plascencia, et al, 2008). En su estudio encontraron alterada la vía Wnt/ β -catenina en un análisis de expresión genómico en CaCU positivo a VPH-16, con un incremento significativo de WNT4, WNT-8a, FZD2, GSK3 β y β -catenina en células tumorales. También encontraron la expresión de sFRP4 (regulador negativo de la vía que compite con las proteínas Wnt) en epitelio normal,

pero no en tejidos de CaCU. Ellos concluyen que el encendido de la vía canónica en CaCU se lleva a cabo por la inactivación de los reguladores negativos SFRP4 y DKK de Wnt.

La vía Wnt parece estar encendida en cultivos de líneas celulares de CaCU enriquecidas con células troncales. En estudios de análisis de expresión génica de líneas celulares de cáncer de cérvix hechos en el laboratorio del Dr. Carrancá se encontraron datos que apuntan a que la vía Wnt está desregulada (López J, et al, 2012). En este estudio se llevó a cabo el enriquecimiento y caracterización de sub-poblaciones celulares altamente tumorigénicas derivadas de líneas celulares de HeLa, SiHa, CaSki y C4-I, y que exhiben características de células iniciadoras de cáncer (CIC) y proliferan formando clusters esféricos no adherentes. El análisis de expresión génica de estos clusters esferoides mediante perfil de expresión con microarreglos de cDNA mostró un incremento en la expresión de marcadores de CICs (CD44, NT5E, ITGB6, MYC, MET, entre otros) , así como de genes involucrados en la reparación del daño a la doble hebra del ADN (RAD51L3, RBBP8, XRCC6, RAD51, RAD21, entre otros) y de genes involucrados en EMT (transición epitelio-mesénquima) (VIM, SERPINE1, LEF1, CTNNB1, YBX1, entre otros), en comparación al cultivo en monocapa de las mismas líneas celulares. Entre los genes que mostraron incremento se encuentran genes relacionados a la vía Wnt, tales como CTNNB1 y LEF1, entre otros. Los cultivos en esfera de las líneas celulares SiHa y HeLa muestran un incremento en las proteínas Nanog y Oct-4 en relación a sus cultivos en monocapa, así como en sus factores de transcripción (Ortiz-Sánchez E, et al, 2016), considerados como marcadores convencionales de troncalidad, lo que es un indicio confiable del enriquecimiento en células troncales de estos cultivos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un mejor conocimiento sobre las llamadas Células Troncales Cancerosas es de gran importancia para comprender de qué manera ellas conducen o contribuyen a la aparición y/o mantenimiento del tejido tumoral. Diversas vías de señalización intervienen en procesos diversos tales como división celular, diferenciación y apoptosis, de manera que es importante saber cómo están alteradas en éstas Células Troncales Cancerosas. La alteración en la vía Wnt/ β -catenina está frecuentemente asociada a diferentes tipos de cáncer, de modo que es importante conocer si está alterada en Células Troncales de cáncer cervicouterino y en que parte de la vía, pues juega un papel fundamental en procesos de proliferación celular, polaridad, migración, apoptosis y otros, determinantes en el desarrollo de los procesos tumorales. Las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino son un modelo adecuado y reproducible para estudiar el cáncer de cérvix y 2 de estas líneas celulares ampliamente usadas son HeLa y SiHa. Los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales de éstas líneas celulares (cervoesferas) ya se han establecido, pero los trabajos para caracterizarlos son aún pocos. En ése sentido, éste trabajo contribuye a esta caracterización, abonando al conocimiento principalmente de la línea celular SiHa.

Así, la pregunta a responder en éste trabajo es:

¿En los cultivos en esferas de líneas celulares de Cáncer Cervicouterino enriquecidos en Células Troncales, particularmente SiHa, la vía Wnt/ β -catenina está encendida en comparación con los cultivos en monocapa?

IV. HIPOTESIS

En los cultivos en esfera de la línea celular SiHa de Cáncer Cervicouterino enriquecidos en Células Troncales hay una actividad mayor de la vía Wnt/ β -catenina que en los cultivos en monocapa de la misma línea celular.

V. OBJETIVOS

GENERAL:

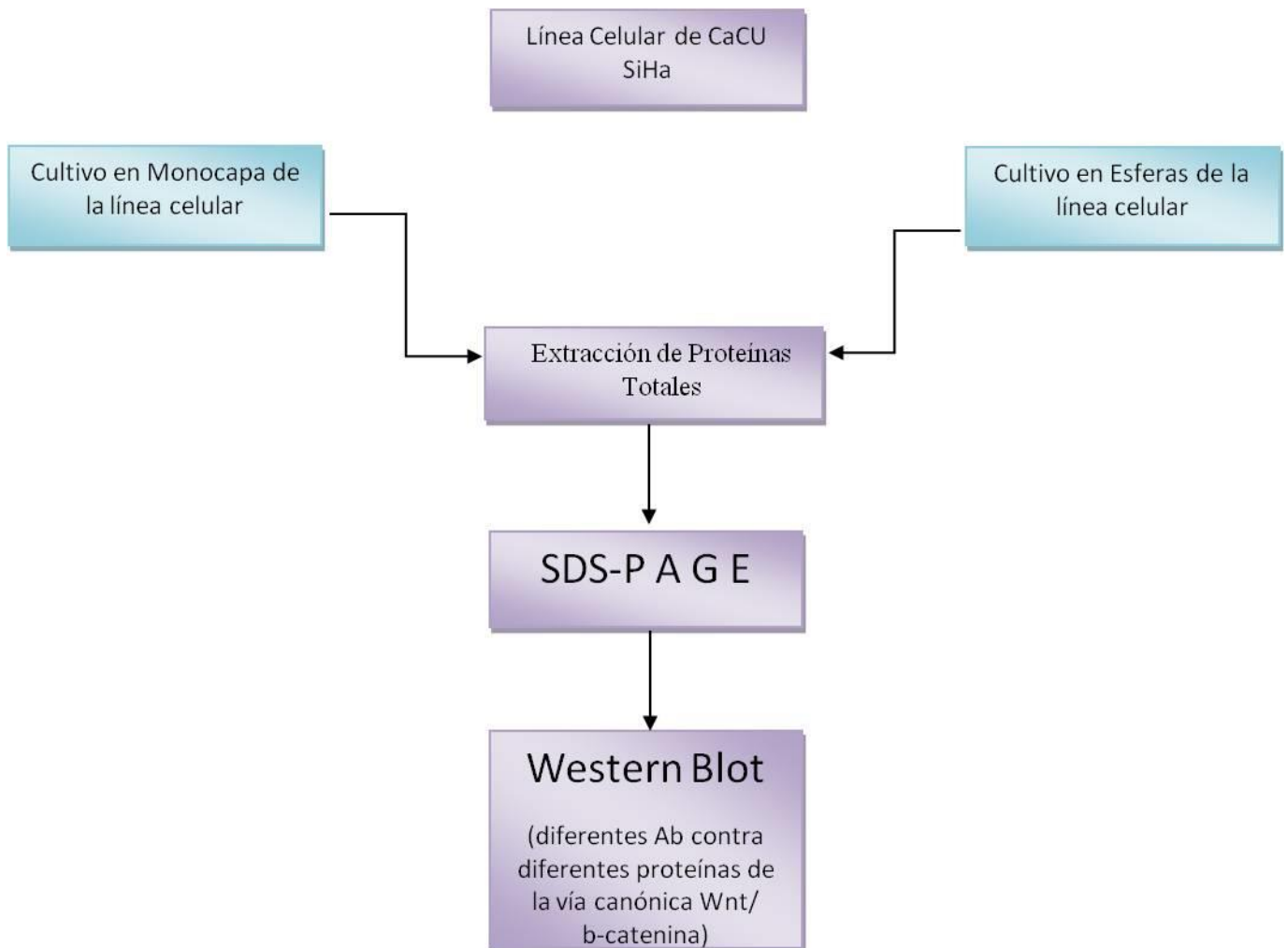
- Analizar la actividad de la vía Wnt/ β -catenina en los sistemas de esferas enriquecidos de células troncales y en los sistemas en monocapa en la línea celular SiHa de Cáncer de Cérvix, y establecer si esta actividad es diferente en ambos sistemas.

PARTICULARES:

- Evaluar la presencia de las proteínas β -catenina, axina 1, Gsk3 β , ck1 α , β -catenina fosforilada, dvl 1, dkk 1, que forman parte de la vía Wnt/ β -catenina, en esferas de la línea celular SiHa de cáncer de cérvix por medio de ensayos de Western-blot, y compararla con la cantidad presente en cultivos en monocapa.
- Coadyuvar a la caracterización de los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales en líneas celulares de cáncer de cérvix.

VI. METODOLOGÍA

ESTRATEGIA GENERAL



6.1 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares SiHa y HeLa de cáncer cervico uterino, la primera que proviene de un carcinoma escamoso de cérvix humano, y la segunda de un adenocarcinoma de cérvix humano.

Para los cultivos celulares en monocapa, las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM (Gibco), suplementado con suero fetal de bovino (SFB, Gibco) al 10% y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco), cultivadas a 37°C con CO² al 5% y humedad al 70% en condiciones adherentes en placas de 100 mm X 20 mm (REF 430293, Corning).

Los cultivos en esfera (cervoesferas) se realizaron a partir de cultivos en monocapa con 70 % de confluencia. Las células se tripsinizaron (EDTA 0.05% en PBS), se lavaron con PBS para remover por completo el SFB, y se sembraron en número de 2x10³ células/ml en condiciones de no adherencia utilizando placas de 6 pozos de ultra baja adherencia (Corning Inc., Corning NY, USA), en medio basal MammoCult® Human Medium Kit REF 05620 (STEMCELL Technologies) suplementado con 0.0004% de Heparina (STEMCELL Technologies), 0.48 mg/ml de Hidrocortisona (STEMCELL Technologies), 10% de suplemento de Proliferación Mammocult® (STEMCELL Technologies) y 1% de penicilina-estreptomicina (STEMCELL Technologies), y se cultivaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

6.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

6.2.1 CULTIVOS EN MONOCAPA.

1. La caja de cultivo se colocó sobre una cama de hielo.
2. Se lavó el cultivo con 3 ml de PBS 1X.
3. Se aspiró el PBS y se agregaron 2 ml de tripsina.
4. Se dejó incubando 10 minutos.
5. Pasado el tiempo se rasparon las células y se pasaron a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
6. Se agregó 1 ml de buffer RIPA, adicionado con inhibidores de Proteasas y Fosfatasa.
7. Se dejó incubando durante 20 min.
8. Se pasaron las células 10 veces a través de una jeringa con aguja calibre 22G.
9. Se centrifugó 10 minutos a 4°C a 13 000 rpm.
10. Se recuperó el sobrenadante y se midió concentración de proteínas, usando el método Bradford.

6.2.2 CULTIVOS EN ESFERA.

1. El contenido completo de cada caja de cultivo de esferas se transfirió a un tubo Falcon estéril de 15 ml.
2. El tubo se mantuvo en reposo durante 10 minutos para que las esferas sedimentaran.
3. El sobrenadante se pasó a otro tubo Falcon estéril de 15 ml y se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet.
4. Se juntaron las 2 partes sedimentadas de esferas en un solo tubo.
5. Se lavaron una vez con 3 ml de PBS 1X.
6. Se centrifugó la muestra nuevamente durante 10 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet.
7. Se transfirió a 1 tubo eppendorf de 1.5 ml.
8. Se agregó 1 ml de buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% desoxicolato, 0.1% SDS y 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) adicionado con coctel de inhibidores de Proteasas y Fosfatasa.
9. Se incubó durante 20 min y se midió concentración de proteínas, usando el método Bradford.

6.3 ENSAYOS DE WESTERN BLOT.

Muestras conteniendo 20 µg de proteína fueron hervidas en buffer de carga 1x (50 mM Tris-Cl, 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0.1% azul bromofenol, 10% (v/v) glicerol). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquero en una solución de leche baja en grasa en TBS-T (con Tween-20 al 0.1%) por 1 hora. Finalmente se incubaron con los anticuerpos primarios seleccionados (12 h a 4°C en agitación suave):

- *β-catenina*: Ab Anti-Human beta-Catenin Purified, eBioscience 1:2000.
- *Axina 1*: Ab Anti-Human AXIN1, GeneTex 1:1000.
- *GSK3β*: Ab Anti-GSK3β, Cell Signaling 1:1000.
- *CK1α*: Ab Anti-CK1α, GeneTex 1:1000.
- *β-catenina fosforilada*: Ab Anti-beta catenin phospo Ser33/Ser37, GeneTex 1:1000.
- *DVL 1*: Ab Anti-Human DVL1, GeneTex 1:1000.
- *DKK1*: Ab Anti-DKK1, GeneTex 1:1000.

Y como controles de carga:

- *GAPDH*: Ab Anti-Human GAPDH, S Cruz Biotechnology 1:1000.
- Ab Anti-Human actin, S Cruz Biotechnology 1:1000.

Y después con los anticuerpos secundarios (1 h a temperatura ambiente en agitación suave):

Donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020, S Cruz Biotechnology 1:10000); Donkey anti-rabbit IgG-HRP (sc-2313, S Cruz Biotechnology 1:10000); Goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, S Cruz Biotechnology 1:10000).

Para el revelado se incubó la membrana con el sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP (No. cat. WBKLS0500, EMD Millipore) y se observó la imagen con el equipo Li-COR (Biosciences).

6.4 ANALISIS DE IMÁGENES

Se hizo densitometría de las imágenes mediante el software ImageJ[®] y se realizó un análisis estadístico aplicando la prueba t de student, considerando un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

β -catenina, principal efector de la vía.

Con el objeto de conocer si existen diferencias en los niveles de β -catenina -principal efector de la vía canónica de Wnt- en los cultivos enriquecidos con células troncales cancerosas (cultivos en esfera) en comparación con cultivos de monocapa en la línea celular SiHa, analizamos sus niveles por western blot. Como lo muestra la **Figura 6**, encontramos que la cantidad de la proteína β -catenina en extractos totales fue mayor en los cultivos en esfera (E) que en los cultivos en monocapa (M), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Encontramos por densitometría de las imágenes 8.8 veces más β -catenina en los cultivos en esfera que en los de monocapa.

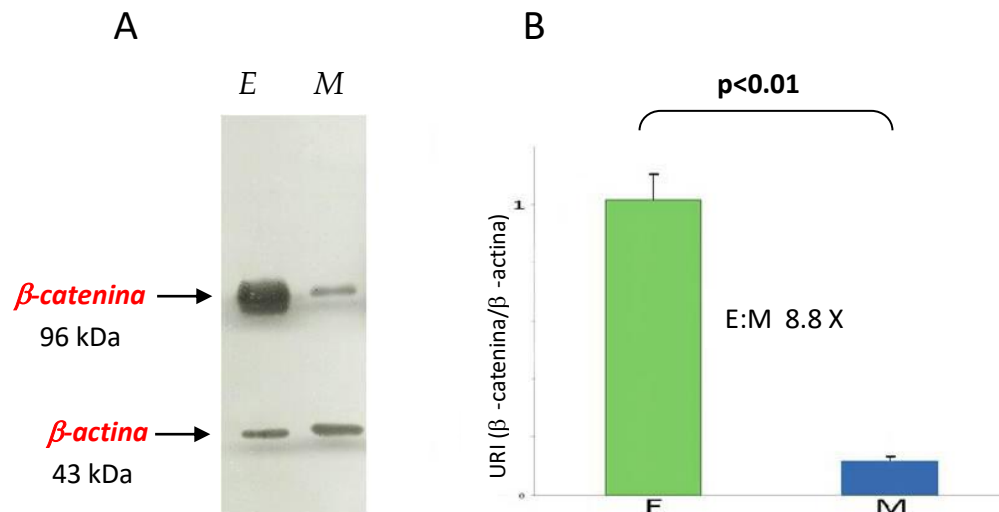


Figura 6. Los niveles de la proteína β -catenina son mayores en los cultivos enriquecidos con células troncales cancerosas (cultivos en esfera). **A-** Western blot para β -catenina en extractos totales de proteína en cultivos de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a β -catenina, normalizado con β -actina ($n=3$). La diferencia entre Esfera y Monocapa es estadísticamente significativa, determinada por la prueba t de Student. Los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE.

URI= Unidades Relativas de Intensidad; E:M = veces de cambio esfera/monocapa; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

Complejo de Destrucción de β -catenina.

Para saber si existen diferencias en los niveles de otras proteínas involucradas en la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina en los cultivos enriquecidos con células troncales se hizo Western blot para varias de estas proteínas. Se analizaron niveles tanto de proteínas que actúan como reguladoras positivas de la vía, como de reguladoras negativas y encontramos los siguientes niveles de proteínas involucradas en el complejo de destrucción de β -catenina.

Axina 1.

En la **Figura 7** observamos los niveles de la proteína **axina 1**, que actúa como andamio en el complejo de destrucción, siendo así un regulador negativo de la vía canónica. Encontramos menores niveles de la proteína en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La densitometría de las imágenes nos indica 10.2 veces más axina en los cultivos en monocapa que en los cultivos en esfera.

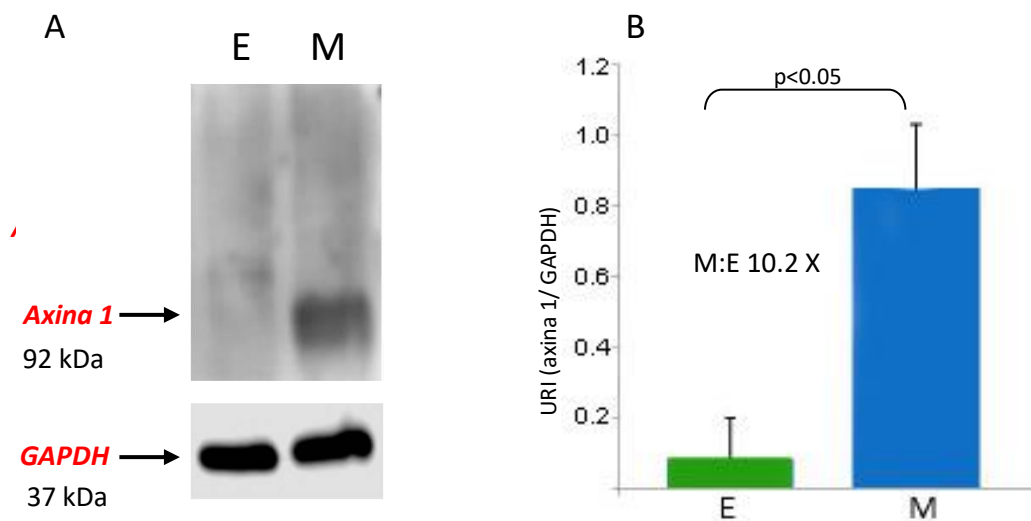


Figura 7. Los niveles de Axina 1, regulador negativo de la vía canónica, son menores en los cultivos en esfera.

A- Western blot para Axina 1 en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a axina 1, normalizado con GAPDH (n=2). La diferencia entre esfera y monocapa es estadísticamente significativa determinada por la prueba t de Student. Los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE.

URI= Unidades Relativas de Intensidad; M:E = veces de cambio monocapa/esfera; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

Cinasa Gsk3 β .

Otra proteína importante en el complejo de destrucción de β -catenina es **GSK3 β** . El nivel de ésta proteína, que fosforila a β -catenina dentro del complejo de destrucción y la marca para su posterior degradación, es mayor en los cultivos en monocapa respecto a los cultivos en esferas (**Figura 8**). Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por densitometría de las imágenes encontramos 3.2 veces más GSK3 β en los cultivos en monocapa que en los cultivos en esfera.

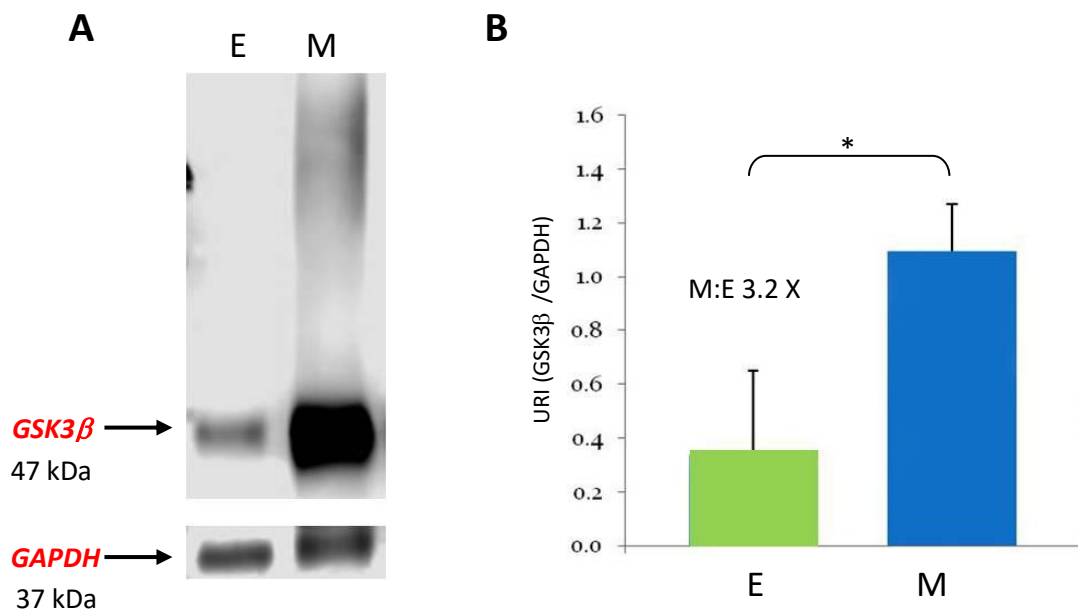


Figura 8. Los niveles de la proteína GSK3- β –regulador negativo de la vía- son mayores en los cultivos en monocapa.

A- Western blot para GSK3 β en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a GSK3 β , normalizado con GAPDH (n=2). *La diferencia entre esfera y monocapa no es estadísticamente significativa. Los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE.

URI= Unidades Relativas de Intensidad; M:E = veces de cambio monocapa/esfera; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

Cinasa Ck1 α .

Al analizar los niveles de la proteína **CK1 α** , regulador negativo de la vía en el complejo de destrucción y que fosforila a β -catenina, encontramos una cantidad mayor de ésta proteína en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa (**Figura 9**). La densitometría nos muestra 3 veces más proteína en los cultivos en esfera que en monocapa.

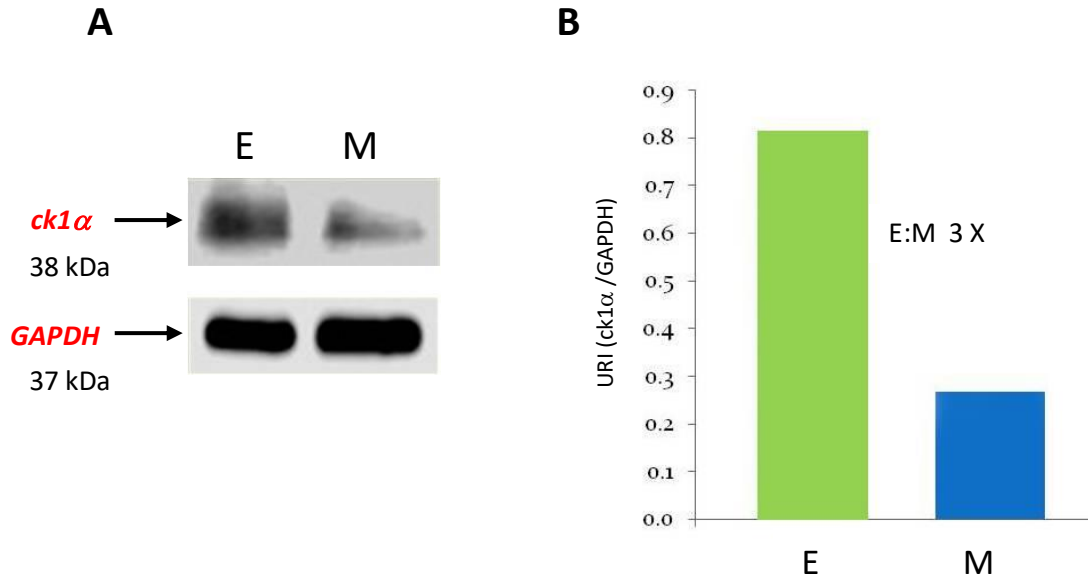


Figura 9. La cantidad de la proteína CK1 α es mayor en los cultivos en esfera. **A-** Western blot para CK1 α en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a CK1 α , normalizado con GAPDH. URI= Unidades Relativas de Intensidad; E:M = veces de cambio esfera/monocapa; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

β -catenina fosforilada.

También analizamos los niveles de β -catenina fosforilada en los residuos Ser33 y Ser 37 (**Figura 10**). Esta fosforilación se lleva a cabo por GSK3 en la vía canónica, y se conforman así sitios de unión para β -TrCP. Encontramos una mayor cantidad de β -catenina fosforilada en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa (2 veces más proteína en análisis de densitometría).

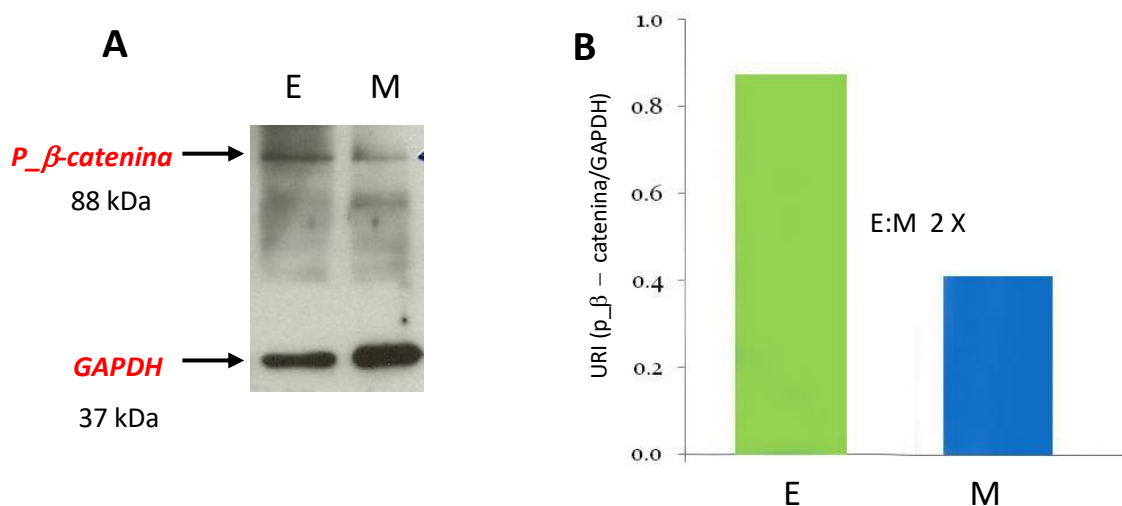


Figura 10. La cantidad de la proteína p- β -catenina es mayor en los cultivos en esfera. **A-** Western blot para p- β -catenina en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a p- β -catenina, normalizado con GAPDH. URI= Unidades Relativas de Intensidad; E:M = veces de cambio esfera/monocapa; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

Otras proteínas.

También analizamos los niveles de otras proteínas de la vía canónica que no forman parte del complejo de destrucción.

Dishevelled 1 (Dvl 1).

La proteína Dvl 1 (Dishevelled) es un regulador positivo de la vía que, al polimerizarse, inactiva el complejo de destrucción. Encontramos mayores niveles de ésta proteína en los cultivos enriquecidos con células troncales cancerosas (esferas) que en los cultivos en monocapa (**Figura 11**) (2.4 veces más por densitometría).

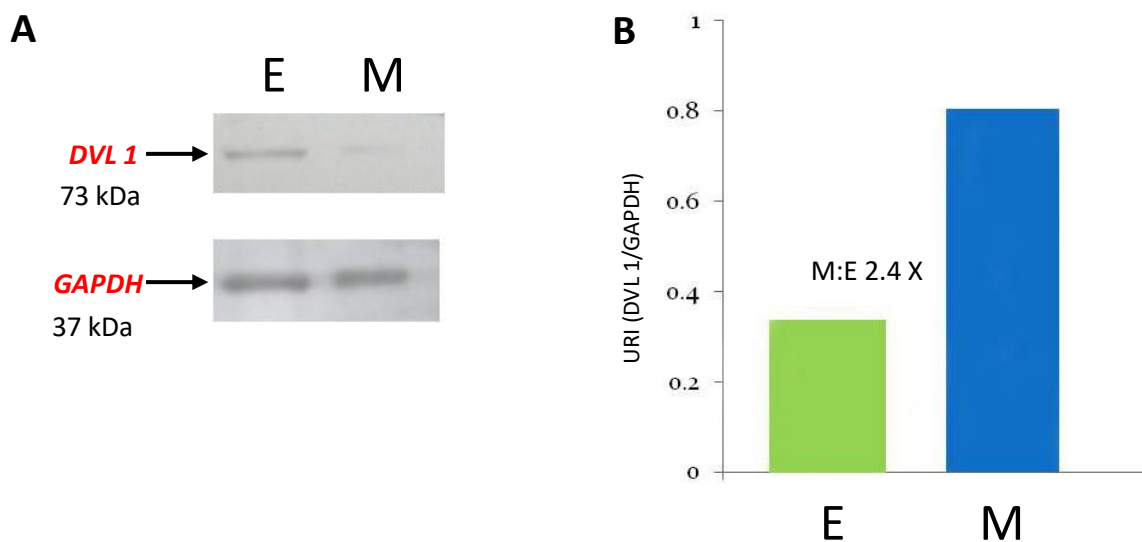


Figura 11. Los niveles de la proteína DVL 1 (Dishevelled), reguladora positiva de la vía Wnt/ β -catenina, son mayores en los cultivos en esfera. A- Western blot para comparar niveles de DVL 1 en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. B- Cuantificación de las URI en relación a DVL 1, normalizado con GAPDH.

URI= Unidades Relativas de Intensidad; M:E = veces de cambio monocapa/esfera; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

Dkk 1.

Al analizar los niveles de la proteína **Dkk 1**, regulador negativo de la vía que se une a los receptores LRP5/6 compitiendo con Wnt, la cantidad de proteína encontrada en los extractos de los cultivos en esferas fue

mayor que la encontrada en los cultivos en monocapa (1.4 veces más proteína en análisis de densitometría)

(Figura 12).

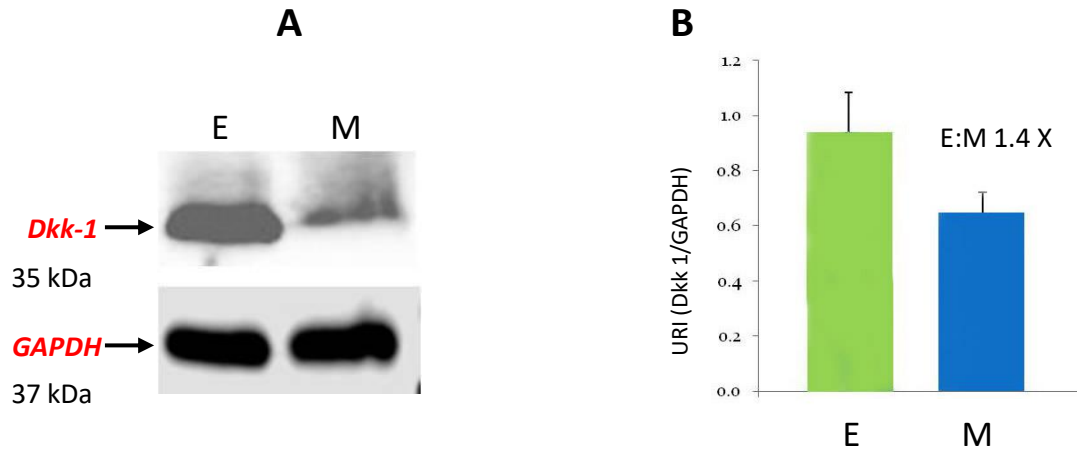


Figura 12. Los niveles de Dkk 1 en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa son mayores en los cultivos en esfera. **A-** Western blot para Dkk 1 en extractos totales de proteína de la línea celular SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a Dkk 1, normalizado con GAPDH (n=2).

URI= Unidades Relativas de Intensidad. E:M = veces de cambio esfera/monocapa; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

β -catenina en la línea celular HeLa de cáncer cervico uterino.

Quisimos saber también si la cantidad de β -catenina en otra línea celular de cáncer cervico uterino seguía el mismo patrón encontrado en los cultivos en esfera y monocapa de la línea celular SiHa. Para ello analizamos β -catenina en cultivos celulares en esfera y monocapa de la línea HeLa de cáncer cervico uterino (**figura 13**). Encontramos resultados opuestos, con más cantidad de β -catenina en los cultivos en monocapa que en los cultivos en esfera (casi 2 veces más), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

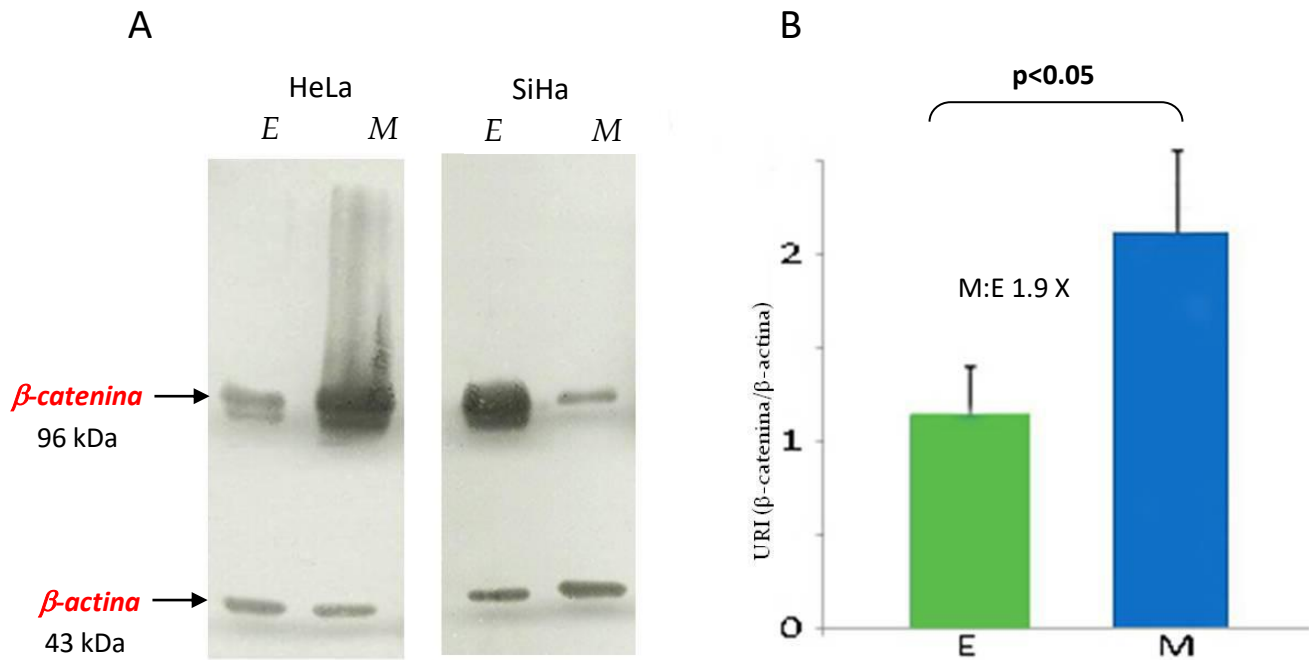


Figura 13. Los niveles de la proteína β -catenina en cultivos en monocapa y en esfera de la línea celular HeLa de CaCU son opuestos a los encontrados en la línea celular SiHa. **A-** Western blot para β -catenina en extractos totales de proteína en cultivos de la línea celular HeLa en comparación con el western blot para SiHa. **B-** Cuantificación de las URI en relación a β -catenina en cultivos de la línea celular HeLa, normalizado con β -actina ($n=3$). La diferencia entre Esfera y Monocapa es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), determinada por la prueba t de Student. URI= Unidades Relativas de Intensidad; M:E = veces de cambio monocapa/esfera; E=Cultivo en Esfera, M=Cultivo en Monocapa.

VIII. DISCUSIÓN

Existe una relación evidente de la vía de señalización Wnt con el inicio y/o mantenimiento de diversos tipos de cáncer, como son el cáncer gastrointestinal, leucemia, melanoma, mama, entre otros (Zhan T, Rindtorff N & M Boutros, 2017). Así también se ha aceptado un papel importante de esta vía en el funcionamiento de las células troncales normales y cancerosas (Reya T & Clevers H, 2005).

β-catenina, principal efector de la vía canónica, se encuentra en mayor cantidad en los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales de la línea celular SiHa.

La vía canónica Wnt/β-catenina tiene como principal efector a la proteína β-catenina, de manera que iniciamos analizando los niveles de esta proteína en el modelo de cultivo celular enriquecido con células troncales cancerosas (esferas) usado en éste estudio, en comparación con el cultivo en monocapa.

Los niveles de la proteína β-catenina que encontramos por Western blot en nuestro estudio son claramente mayores (casi 9 veces más) en los cultivos en esfera de la línea celular SiHa (**Figura 6**), lo cual puede resultar de una alta actividad de la vía canónica Wnt/β-catenina en éste tipo de cultivo en comparación con el cultivo en monocapa. Esta mayor actividad de la vía en cultivos en esfera también se ha visto en esferas de cáncer de colon, asociándose a la presencia de CSC, y se ha sugerido la actividad de esta vía como marcador de clonogenicidad y troncalidad (Vermeulen L, et al, 2010). La proteína β-catenina se acumula en el citoplasma celular cuando el complejo de destrucción no actúa mas sobre ella, como sucede cuando la vía está apagada, y puede entonces trasladarse al núcleo para cumplir su papel de efector. Existen varias hipótesis de cómo sucede esto, pero aun no se esclarece por completo el mecanismo que lleva a la acumulación de β-catenina en citoplasma para trasladarse al núcleo.

El complejo de destrucción de β -catenina parece estar menos activo en los cultivos enriquecidos con células troncales.

Si los niveles de β -catenina en los cultivos enriquecidos con células troncales de nuestro estudio están elevados, significa que el complejo de destrucción que mantiene niveles bajos de β -catenina mediante su destrucción proteosomal no está degradando la proteína.

- ***Axina 1 tiene más presencia en los cultivos en monocapa.***

Una de las proteínas importantes de esta vía canónica de señalización es la proteína citoplásmica **Axina**, de 92 kDa de MW. Esta proteína forma parte central del llamado “complejo de destrucción”, ensamblando a Gsk3, APC, Ck1 y a β -catenina. En ausencia de Wnt, el complejo fosforila a β -catenina, que es después ubiquitinada por β -TrCP y marcada así para su posterior degradación proteosomal. En presencia de Wnt la proteína axina es desfosforilada, disminuyendo su afinidad por β -catenina, e incluso llegando a degradarse (Krishnamurthy N & R Kurzrock, 2017) y se ha propuesto que la degradación de axina 1 en células estimuladas por Wnt sería la causa inmediata de la estabilización de β -catenina (Mao J, et al, 2001). La degradación de axina inducida por la presencia de Wnt parece jugar un papel determinante en la señalización de β -catenina (Xi He, 2003). En nuestro estudio encontramos menores niveles de la proteína **Axina 1** en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa (**Figura 7**), probablemente porque se está degradando en los cultivos en esfera. Dado que el número de complejos de destrucción en una célula puede depender de los niveles de axina (Lee E, et al, 2003), la mayor cantidad de axina en los cultivos en monocapa podría representar una mayor cantidad de estos complejos de destrucción, y por tanto una actividad menor de la vía Wnt/ β -catenina, en estos cultivos en comparación con los cultivos en esfera. Se ha mostrado que una sobre-expresión de axina fuertemente regula a la baja a β -catenina (Hart MJ, et al,

1998). En contraposición, los menores niveles de axina en los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales podrían deberse a la presencia de Wnt encontrándose una actividad mayor de la vía canónica.

- ***Gsk3 β tiene mayor presencia en los cultivos en monocapa.***

La cinasa Gsk3 β tiene un papel relevante en el complejo de destrucción, pues fosforila a β -catenina facilitando así su ubiquitinación por β -TrCP y su posterior degradación proteosomal. Al analizar los niveles de Gsk3 β encontramos mayores niveles de esta proteína en los cultivos en monocapa que en los cultivos en esfera (3.2 veces más) (**Figura 8**), lo cual puede reflejar una mayor presencia de la cinasa que lleva a cabo su acción en los complejos de destrucción para mantener bajos los niveles de β -catenina. En los cultivos en esfera, donde pensamos que la vía tiene una actividad mayor, los niveles de Gsk3 β están más bajos, pues habría menos complejos de destrucción. Se ha reportado que la disminución en la actividad de la cinasa Gsk3 puede estar mediada por Dishevelled cuando la vía está activa (Desbois-Mouthon C, 2001), y se ha visto que factores de crecimiento pueden estabilizar β -catenina mediante la fosforilación de Gsk3 β , lo que inactiva a esta cinasa (Desbois-Mouthon C, et al, 2001; Playford M, et al, 2000). La actividad de esta cinasa se ha reportado inhibida en células de cáncer de mama (Wu Z-Q, et al, 2012) y este hecho también se ha relacionado con el inicio de los programas transcripcionales de la Transición Epitelio Mesénquima (EMT) en el mismo cáncer de mama, y que dirige a procesos metastásicos (Wu Z-Q, et al, 2012). Existen estudios que muestran que la presencia de inhibidores de Gsk3, como BIO o CHIR99021, o la presencia del ligando Wnt3a, disminuyen los niveles de Gsk3 y aumentan los niveles de Slug y Snail, que juegan un rol importante en los programas de EMT, en tándem con los niveles de β -catenina (Wu Z-Q, et al, 2012).

- ***Ck1 α , un papel incierto en la vía.***

Otra cinasa involucrada en la vía de señalización de Wnt es Ck1 α , cuyo papel en ella es el de fosforilar a β -catenina en el residuo S45, cebándola para su posterior fosforilación por Gsk3 (Amit S, et al,

2002; Liu C, et al, 2002). Una vez fosforilada por Gsk3, β -catenina puede ser ubiquitinada y luego degradada por proteosoma. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios que indican que la señalización por Wnt inhibe esta fosforilación, reduciendo la actividad de la cinasa (Amit S, et al, 2002; Liu C, et al, 2002), y así su papel de regulador negativo. En nuestro trabajo encontramos mayor presencia de $ck1\alpha$ en los cultivos en esfera que en monocapa (**Figura 9**). Los estudios en torno a ésta proteína son contradictorios aún. Existen 7 miembros de la familia CKI, y se ha visto que regulan tanto positiva como negativamente la señalización de las vías Wnt y Hedgehog, y que están constitutivamente activas y se sugiere que hay redundancia entre las isoformas de CKI en la activación de la vía Wnt (Price MA, 2006). Se ha visto que $CKI\epsilon$, una de las isoformas, activa la vía Wnt provocando la estabilización de β -catenina (Peters JM, et al, 1999; Sakanaka C, et al, 1999; Gao ZH, et al, 2002), y que fosforila a TCF3, favoreciendo la interacción de éste con β -catenina (Lee E, et al, 2001) Otra isoforma, $Ck1\gamma$, fosforila Lrp6 en respuesta a la señalización por Wnt (Davidson G, et al, 2005; Zeng X, et al, 2005) lo cual favorece su unión con axina, evento importante en la señalización. Sin embargo, algunos grupos han encontrado también funciones de activación de $ck1\alpha$ (McKay RM, et al, 2001). Se piensa que los efectos positivos sobre la vía se llevan a cabo por varios miembros de la familia, de manera que $ck1\alpha$ puede estar cumpliendo esta función activadora en las cervo-esferas de nuestro trabajo. Otra posibilidad es que β -catenina tenga sitios de fosforilación mutados, como sucede en otros tumores, que impidan que la cinasa $ck1\alpha$ se una a β -catenina y cumpla su función regulatoria negativa. La mayor presencia de $ck1\alpha$ en las cervo-esferas también puede podría explicarse porque esté activando la vía Hedgehog, fosforilando a Smo y permitiendo la acumulación y traslocación al núcleo de Ci-155, proteína activadora de la vía (Price MA, 2006).

- ***β -catenina fosforilada.***

β -catenina es fosforilada por Gsk3b en los residuos Ser 33 y Ser 37. Esta β -catenina queda así lista para ser marcada por β -TrCP para su degradación. Lo que encontramos fue una mayor cantidad de esta

proteína en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa (**figura 10**). Li V y su grupo (2012) argumentan que β -catenina se sigue fosforilando en los complejos de destrucción cuando Wnt está presente, y que esto provoca una saturación de los complejos, bloqueándose su función de degradación de β -catenina, promoviendo que ahora la β -catenina creada de novo sea la que se trasloque al núcleo. Esta mayor cantidad de β -catenina fosforilada en los cultivos en esfera podría estar reflejando la saturación de los complejos de destrucción que quedan en los cultivos en esfera, y que ya no están degradando a β -catenina.

Otras proteínas con un papel dentro de la vía canónica también parecen indicar una mayor actividad de la vía Wnt/ β -catenina en los cultivos en esfera.

- ***Dvl 1, en mayor cantidad en cultivos en esfera.***

Analizando otras proteínas involucradas en la vía, fuera ya del complejo de destrucción, observamos que los niveles de la proteína **Dvl 1** son mayores en los cultivos en esfera (**Figura 11**). Dvl 1 se considera un regulador positivo de la vía, pues una vez que el ligando Wnt se une a los receptores Fzd y Lrp, éstos últimos son fosforilados por ck1 y Gsk3 β , y esto provoca el reclutamiento de Dvl a la membrana y su polimerización (Zhan T, Rindtorff N & M Boutros, 2017). Estos polímeros desestabilizan de alguna manera el complejo de destrucción (atrayendo a axina a la membrana y provocando la desestabilización del complejo), resultando en estabilización y acumulación de β -catenina en citoplasma, que puede entonces trasladarse al núcleo. Los niveles mayores de Dvl 1 en los cultivos en esfera apoyan los indicios de una mayor actividad de la vía Wnt/ β -catenina en éstos cultivos.

- ***Dkk 1.***

Dkk 1 se considera un regulador negativo de la vía, pues compite con Wnt por los receptores que la activan. Se une al receptor Kremen, secuestrando Lrp 5/6, de manera que el complejo Dkk1-Kremen-Lrp

5/6 es removido por endocitosis de la membrana celular (Foltz G, et al, 2010), provocando inhibición de la vía wnt canónica. Los niveles de Dkk 1 que observamos son mayores en los cultivos en esfera que en los cultivos en monocapa (**Figura 12**). Este dato coincide con lo encontrado por López J y cols. (2012), donde la expresión del gen DKK1 es 1.5 veces mayor en los cultivos en esfera de la línea celular SiHa comparada con la expresión del mismo gen en cultivos de monocapa de la misma línea celular. Algunos estudios han revelado que, aún si el inhibidor negativo Dkk1 está presente, no ejerce su efecto inhibitorio en la vía Wnt si existen mutaciones en algunas proteínas río abajo de la vía, aunque no se sabe el mecanismo para ello. Tal es el caso de mutaciones en APC (Aguilera O, et al, 2006) en líneas celulares de cáncer de colon. Podemos pensar entonces que en las cervo-esferas de nuestro estudio, aunque Dkk-1 está presente, no ejerce su efecto inhibitorio de la vía, quizá porque haya alguna proteína mutada río abajo en la vía. Algunos estudios sugieren que algunos reguladores negativos de la vía Wnt/ β -catenina puedan estar inactivados por metilación durante la carcinogénesis cervical (Oates N, et al, 2006; Yang H, et al, 2006; Lee J, et al, 2008). La expresión de DKK1 está regulada negativamente en tumores de cáncer de colon (González-Sancho, et al, 2005) y se ha encontrado que hay silenciamiento del gen DKK1 en algunas líneas celulares de CaCU por procesos epigenéticos (Lee J, et al, 2008). Así, en la línea celular HeLa se han visto patrones de silenciamiento del gen por metilación y por desacetilación de histonas, encontrándose niveles muy bajos de ARNm de DKK1, no así en la línea celular SiHa, en donde no se detectó metilación, y sí se encontró presente el ARNm de DKK1 (Lee J, et al, 2008).

No todas las esferas de líneas celulares de CaCU tienen una activación mayor de la vía Wnt/ β -catenina.

Lo que encontramos en la línea celular HeLa de CaCU fue un patrón claramente opuesto a lo que encontramos en la línea celular SiHa para β -catenina (**figura 13**). En la línea celular HeLa, β -catenina está en mayor cantidad en los cultivos en monocapa que en los cultivos en esfera. Ortiz-Sanchez y cols (2016) encontraron por citometría de flujo sólo un ligero incremento de β -catenina en los cultivos en esfera de la línea celular HeLa comparada con monocapa. Aunque ambas líneas celulares, SiHa y HeLa, son de cáncer

cervico uterino, existen diferencias importantes entre ellas. SiHa es una línea celular positiva a HPV 16, derivada de carcinoma de células escamosas del cérvix. HeLa es una línea celular positiva a HPV 18, de células de adenocarcinoma cervical humano. Las oncoproteínas E6 y E7 de los Virus de Papiloma Humano se encuentran regularmente expresadas en tejidos cancerosos y juegan un papel relevante en el inicio y mantenimiento del cáncer (Klingelhutz AJ & A Roman, 2012). Podríamos pensar entonces que en las esferas de la línea celular SiHa la activación de la vía canónica Wnt/ β -catenina es de fundamental importancia para el crecimiento y mantenimiento del tumor, en tanto que para las esferas de la línea celular HeLa no lo es, interviniendo para ello posiblemente otras vías de señalización. Diferentes tipos de VPH parecen incidir de maneras diferentes en la activación o no de diferentes vías de señalización en el tejido canceroso. Hay estudios en el sentido de que la presencia de VPH 16 está conectada con la activación de la vía Wnt/ β -catenina. Existe evidencia experimental de que la proteína E6 de VPH 16 aumenta la transcripción génica dependiente de la vía Wnt/ β -catenina (Lichtig H, et al, 2010). También aumenta la señalización de la vía con la presencia de las proteínas E6 y E7 de VPH 16 en células de carcinoma escamoso orofaríngeo (Rampias T, et al, 2010). La proteína E6 de VPH 16 es estabilizada de alguna manera por la proteína ligasa E6AP y ambas cooperan para facilitar la traslocación y acumulación nuclear de β -catenina, aunque no se conoce el mecanismo exacto de cómo sucede (Sominsky S, et al, 2014). Parece entonces que hay una conexión entre la presencia de VPH 16 en CaCU y la activación de la vía Wnt/ β -catenina. También existen diferencias en morfología, tamaño y compactación entre esferas de diferentes líneas celulares de CaCU (Ortiz-Sánchez E, et al, 2016) y esto podrías sugerir que hay diferencias en las CSC de las diferentes esferas.

Mayor cantidad de reguladores positivos y menor cantidad de reguladores negativos de la vía canónica wnt/ β -catenina en las cervo-esferas de SiHa.

En la **figura 14** podemos ver en conjunto los resultados encontrados de las diferentes proteínas analizadas. Por un lado, encontramos niveles más altos de β -catenina y de Dvl, principal efector de la vía y

regulador positivo de la misma, respectivamente y esto podría ser indicativo de que el complejo de destrucción que marca a β -catenina para su destrucción proteosomal no está llevando a cabo ésta función, quizá porque están saturados y bloqueados por β -catenina fosforilada, y β -catenina está acumulada en las células del cultivo en esfera. Por el otro, encontramos niveles más bajos de Axina 1 y Gsk3 β , reguladores negativos de la vía. Las cantidades menores de axina 1 nos indican que puede haber menos complejos de destrucción en éstos cultivos, en tanto que los niveles bajos de Gsk3 β podrían representar una menor actividad sobre β -catenina. La mayor presencia de la proteína β -catenina en los cultivos en esfera en comparación con cultivos en monocapa de la línea celular SiHa también ha sido observada mediante estudios de citometría de flujo (Ortiz-Sánchez E, et al, 2016). La proteína ck1 α , con mayor presencia en esferas, puede estar llevando a cabo una función activadora de la vía, como lo sugieren algunos estudios, en tanto que Dkk1, aunque encontrada en mayor cantidad en esferas, podría no estar cumpliendo un papel inhibitorio.

Los cultivos en esfera de la línea celular SiHa de cáncer cérvico uterino han sido ya parcialmente caracterizados en otros estudios, y presentan diferencias importantes con los cultivos en monocapa de la misma línea celular (López J, 2012; Ortiz-Sánchez E, 2016). Entre estas diferencias se encontró que en los cultivos en esfera hay una mayor presencia del marcador **CD49f** de troncalidad en epidermis humana, que es una alfa integrina postulada para ser el blanco receptor principal del virus VPH en carcinogénesis cervical (López J, et al, 2012; Ortiz-Sánchez E, et al, 2016). También se encontró una mayor capacidad de formar tumores cuando se inyectaron en ratones atímicos desnudos, una mayor radio resistencia ante tratamiento de rayos X, y una mayor expresión de genes relacionados con marcadores de células troncales y CSC epiteliales, así como de genes asociados a la Transición Epitelio Mesenquima (EMT), entre ellos el gen CTNNB1 (que codifica β -catenina) (López J, et al, 2012), cuya proteína la encontramos en cantidad notablemente mayor en las esferas de SiHa. Ortiz-Sánchez E y cols (2016) describieron un perfil fenotípico característico en los cultivos en esfera de líneas celulares de CaCU que podría considerarse como fenotipo

de troncalidad de CSC de Cérvix, donde observaron mayor presencia de las proteínas de superficie **CK 17**, que ha sido postulada como marcador de pobre pronóstico en cáncer cervical (Escobar-Hoyos L, 2014), y de **Anexina II**, caracterizada como receptor de HPV. Encontraron también incremento en los factores de transcripción de **Nanog** y **OCT-4**, marcadores convencionales de troncalidad, y también reportaron una mayor actividad de la Aldehido Deshidrogenasa (**ALDH**), actividad enzimática usada para identificar CSC en otros tejidos y cuya actividad se relaciona con la quimioresistencia y la radioresistencia de CSC.

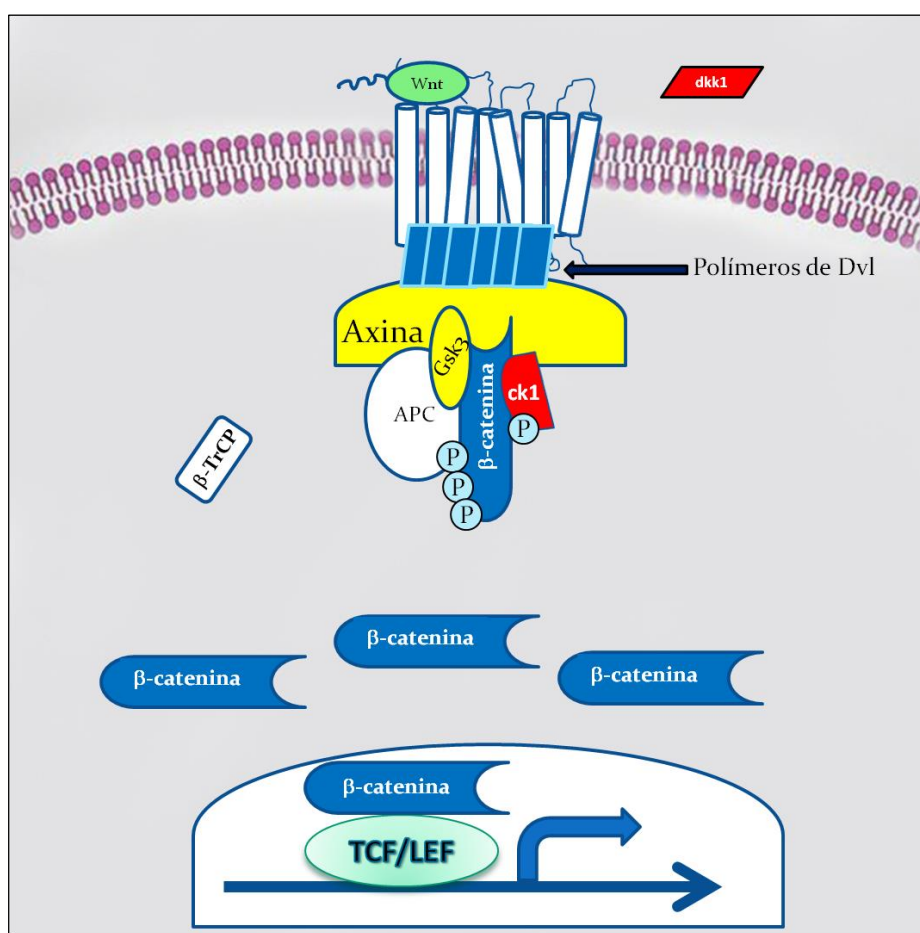


Figura 14. Mayores niveles de proteínas que actúan como reguladores positivos y menores niveles de proteínas que actúan como reguladores negativos en la vía wnt/β-catenina. Los niveles de las proteínas β-catenina y del regulador positivo Dvl 1 son mayores (figuras en azul fuerte) y los niveles de Axina 1 y Gsk3β, reguladores negativos de la vía, son menores en los cultivos en esfera (figuras en amarillo) de la línea celular SiHa, en comparación con los cultivos en monocapa. Algunas proteínas con niveles mayores (ck1 y dkk1, en color rojo) tienen aún papeles inciertos en la vía, y no hay plena certeza de si actúan de manera positiva y/o negativa en la vía. Las proteínas en blanco no fueron analizadas.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del análisis de proteínas de la vía canónica wnt/ β -catenina sugieren que hay una actividad diferencial en la vía entre los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales y en monocapa en la línea celular SiHa (**Figura 14**), y nos permiten postular que sí hay mayor actividad de esta vía en las cervo-esferas que en los cultivos en monocapa de esta línea celular.

Esta mayor actividad de la vía canónica Wnt/ β -catenina en los cultivos en esfera es otra diferencia importante entre los 2 tipos de cultivos celulares, en esfera y en monocapa, en la línea celular SiHa y parece ser que la presencia de VPH 16 es un factor importante para la activación de la vía canónica en las cervo-esferas de la línea celular SiHa, en tanto que la presencia de VPH 18 probablemente no lo sea en las esferas de la línea celular HeLa.

El caracterizar éstos tipos de cultivo en esfera en líneas celulares de cáncer cervico uterino resulta importante por el papel que parecen desempeñar las llamadas Células Troncales Cancerosas en el inicio y mantenimiento de la masa tumoral. Aunque Feng D y cols., desde 2009 ya habían reportado algunas características de Células Iniciadoras del Tumor de cultivos derivados de cáncer de cérvix, tales como su capacidad de auto-renovación y su extensa proliferación, aún falta mucho por conocer de la biología de las células que conforman un tumor de cáncer cervicouterino. Entre más conozcamos de éstas células mejores oportunidades tendremos de encontrar nuevas medidas terapéuticas.

Los resultados de éste trabajo contribuyen así a la caracterización de líneas celulares de CaCU, especialmente de los cultivos en esfera enriquecidos con células troncales. El compartimiento que ocupan las CSC en un tumor debe ser un blanco terapéutico esencial para poder lograr la remisión de un tumor. En éste sentido sigue siendo de fundamental importancia el conocer más de esta sub-población celular.

X. REFERENCIAS

- Aguilera O, et al** (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cáncer. *Oncogene* 25: 4116-4121.
- Al-Hajj M, et al** (2003). Prospective Identification of tumorigenic breast cáncer cells. *PNAS* 100: 3983-3988.
- Alcalá F, et al** (1999). Cáncer cervicouterino invasor. En: Manual de Oncología. McGraw-Hill Interamericana. Pp 369-385.
- Amit S, et al** (2002). Axin mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: A molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Dev.* **16**: 1066– 1076.
- Anastas J & R Moon** (2013). WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer* 13: 11-26.
- Arely LB** (1974). Developmental anatomy: a Textbook and Laboratory Manual of Embriology. 7th. Edición. WB Saunders Co., Londres.
- Banziger C, et al** (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125: 509-522.
- Bartscherer K, et al** (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125: 523-533.
- Becker AJ, et al**, (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452-454.
- Berumen J, et al** (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cáncer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93 (17): 1325-1330.
- Bonnet D & JE Dick** (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730–7.
- Bosch F, et al** (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87: 796-802.
- Bray F, et al** (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population based study. *Lancet Oncol* 13:790-801.
- Bray F, et al** (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 0:1-31, doi: 10.3322/caac.21492.
- Camilli T & A Weeraratna** (2010). Striking the target in Wnt- γ conditions: Intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochemical Pharmacology* 80: 702-711.

- Chávez-González M, et al** (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica* 61(3): 221-232.
- Chávez-González M & Moreno-Lorenzana D** (2011). Células Troncales Tumorales: el modelo de leucemias mieloides. En R Pelayo, J Santa-Olalla & I Velasco (eds.), *Células Troncales y Medicina Regenerativa* (pp 219-237). México: UNAM.
- Chen K, et al** (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharm Sinica* 34:732-740.
- Clarke RB** (2005). Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif* 38:375-386.
- Clevers H** (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* 37(10):1027-1028
- Collins AT, et al** (2005). Prospective Identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951.
- Couture MC, et al** (2008). Inequalities in breast and cervical cancer screening among urban Mexican Women. *Prev Med* 47:471-6.
- Craig T, et al** (2006). Cancer Stem Cells. *N Engl J Med*. 305:1253-1261.
- Dalerba P, et al** (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *PNAS* 104 (24): 10158-10163.
- Davidson G, et al** (2005). Casein kinase I γ couples Wnt receptor to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438: 867-872.
- Derksen P, et al** (2004). Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(16): 6122-6127.
- Desbois-Mouthon C, et al** (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 β inhibition and Ras activation. *Oncogene* 20: 252-259.
- Dórame-López NA, et al** (2017). Detección precoz del cáncer en la mujer, enorme desafío de salud en México. Algunas reflexiones. *Revista de Salud Pública y Nutrición* 16(3): 14-22.
- Dueñas-Gonzalez A, et al** (2003). Modern management of locally advanced cervical carcinoma. *Cancer Treat Rev* 29:389-399.
- Eramo A, et al** (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15: 504-514.
- Escobar-Hoyos L, et al** (2014). Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol* 27:621-630.

- Feng D, et al** (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 22(5): 1129-1134.
- Ferlay J, et al** (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127(12): 2893-917.
- Fleming H, et al** (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2008, 2:274-283
- Foltz G, et al** (2010). Epigenetic Regulation of Wnt Pathway Antagonists in Human Glioblastoma Multiforme. *Genes & Cancer* 1(1): 81-90.
- Fresquet J** (s.f.). Julius Conheim (1839-1884). Historia de la Medicina. Recuperado de: <http://www.historiadelamedicina.org/cohnheim.pdf> nov 2018.
- Gao ZH, et al** (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β -catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci* 99:1182-1187.
- Gersten O & J Wilmoth** (2002). The cancer transition in Japan since 1951. *Demographic Research* 7:271-306.
- Giles R, et al** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Bioch and Bioph Acta* 1653:1-24.
- Gong Y, et al** (2001). LDL Receptor-Related Protein 5 affects bone accrual and eye development. *Cell* 107: 513-523.
- González-Moles M, et al** (2004). B-catenin in oral cáncer: An update on current knowledge. *Oral Onc* 50:818-824.
- González-Sáncho JM, et al** (2005). The Wnt antagonist DIKKOPF-1 gene is a down-stream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24: 1098-1103.
- Goodwin A & P D'Amore** (2002). Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 5: 1-9.
- Gross JC, et al** (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 14:1036-1045.
- Gudjonsson T & K Magnusson** (2005). Stem Cell Biology and the Cellular Pathways of Carcinogenesis. *APMIS*. 113 (11-12): 922-929.
- Gupta P, et al** (2009). Cancer stem cells: mirage or reality?. *Nat Medicine* 15(9): 1010-1012.
- Harris T & M Peifer** (2005). Decisions, decisions: β -catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends in Cell Biology* 15(5): 234-237.
- Hart MJ, et al** (1998). Downregulation of β -catenin by human axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3b. *Current Biology* 8:573-581.

- Hatsell S, et al** (2003). Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:145-158.
- Haydon R, et al** (2002). Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the β -catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 102: 338-342.
- Houghton J, et al** (2004). Gastric Cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.
- Hsieh J, et al** (1999). Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:3546-3551.
- Ishida K, et al** (2007). Nuclear localization of b-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer* 6:62.
- Jaenisch R & R Young** (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* 132: 567-582.
- Jordan CT, et al** (2006). Mechanisms of Disease Cancer Stem Cells. *N Engl J Med* 355:1253-1261.
- Kaluri R & RA Weinberg** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-1428.
- Kelly PN, et al** (2007). Tumor Growth need not to be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317: 337.
- Kimelman D & W Hu** (2006). B-catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25: 7482-7491.
- Kirikoshi H & M Katoh** (2002). Expression and regulation of WNT10B in human cancer: up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by beta-estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid. *Int J Mol Med* 10:507-511.
- Klingelhutz AJ & A Roman** (2012). Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low- risk viruses. *Virology* 424 (2): 77–98.
- Krishnamurthy N & R Kurzrock** (2017). Targeting the wnt/beta-catenin Pathway in Cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev* 62: 50-60.
- Koike J, et al** (1999). Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 262:39-43.
- Komiya Y & R Habas** (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4:2, 68-75.
- Kondo T, et al** (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *PNAS*. 101(3): 781-786.
- Krivstov A, et al** (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442: 818-822.

- Kucia M & MZ Ratajczak** (2006). Stem cells as a two edged sword –from regeneration to tumor formation. *J Phys & Pharm* 57, Supp 7: 5-16.
- Lapidot T, et al** (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 367:645-548.
- Laxmidevi L, et al** (2011). Aberrant b-catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Sci* 52:633-640.
- Lee E, et al** (2001). Physiological regulation of β -catenin stability by Tcf3 and Ck1 ϵ . *J Cell Biol* 154: 983-993.
- Lee E, et al** (2003). The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* 1:e10
- Lee J, et al** (2008). Epigenetic silencing of the WNT antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* 109:270-274.
- Li J & B Zhou** (2011). Activation of b-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer* 11:49.
- Li V, et al** (2012). Wnt Signaling through Inhibition of b-Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149:1245-1256.
- Lichtig H, et al** (2010). HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. *Virology* 396(1): 47–58.
- Liu C, et al** (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dualkinase mechanism. *Cell* 108:837–847.
- Liu H, et al** (2016). CD44+/CD24+ cervical cancer cells resist radiotherapy and exhibit properties of cancer stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20: 1745-1754
- Lizano M, et al** (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 1227-1231.
- Lo Muzio L, et al** (2009). Beta- γ catenin expression in oral displasia. *Oral Oncol* 45:501-504.
- Logan C & R Nusse** (2004). The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Lopez J, et al** (2012). Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 12: 48.
- Luo W, et al** (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J*. 26: 1511–1521.

- Malanchi I, et al** (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on b-catenin signaling. *Nature* 452:650-653.
- Malanchi I & J Huelsken** (2008). Cancer Stem cells: never Wnt away from the niche. *Curr Opin Oncol* 21: 41-46.
- Mani S, et al** (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4): 704-715.
- Mao J, et al** (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7: 801-809.
- Mayani H** (2011). Células Troncales y Medicina Regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras. En R Pelayo, J Santa-Olalla & I Velasco (eds.), *Células Troncales y Medicina Regenerativa* (pp 35-56). México: UNAM.
- McKay RM, et al** (2001). The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol* 24: 2012-2024.
- McWhirter J, et al** (1999). Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11464-11469.
- Metcalfe C, et al** (2010). Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci* 123: 1588–1599.
- Mohammed M, et al** (2016). Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes and Diseases* 3:11-40.
- Montalvo E, et al** (2011). Oncoguía Cáncer Cervico-Uterino. *Cancerología* 6: 61-69.
- Mulligan KA, et al** (2012). Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:370-377.
- Neumann S, et al** (2009). Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* 10:334-343.
- Nojima M, et al** (2007). Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26: 4699-4713.
- Nombela Cano, et al** (2010). Células Madre. Serie de Debates Científicos. La Catarata, CSIC, España. Pag. 96.
- Nusse R & H Clevers** (2017). Wnt/ β -catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169:985-999.
- Oates N, et al** (2006). Increased DNA methylation at the gene in a Monozygotic Twin from a pair discordant for a Caudal Duplication Anomaly. *The American Journal of Human Genetics* 79:155-162.
- O'Brien CA et al** (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110.

- Okino K, et al** (2003). Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 10:1223.
- Ortiz-Sánchez E, et al** (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human Papilloma Virus co-receptor expression. *Oncotarget* 7(22): 31943-54.
- Peifer M & P Polakis** (2000). Wnt signaling in Oncogenesis and Embryogenesis-a look Outside the nucleus. *Science* 287: 1606-1609.
- Peters JM, et al** (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* 401: 345-350.
- Perez-Plasencia, et al** (2008). Activación de la vía Wnt/beta catenina en el proceso de carcinogénesis cervical. *Archivos de Medicina* 4(5): 6.
- Playford M, et al** (2000). Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability and transcriptional activity of beta catenin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:12103-12108.
- Ponti D, et al** (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65: 5506-5551.
- Preston SL, et al** (2003). The new stem cell biology: something for everyone. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 56:86-96.
- Price MA** (2006). Ck1, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev* 20: 399-410.
- Rampias T, et al** (2010). Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 8(3): 433-443.
- Reya T & Clevers H** (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434:843-850.
- Reynolds BA & S Weiss** (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13.
- Ricci-Vitiani L, et al** (2007). Identification and expansion of human colon cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115.
- Ross S, et al** (2000). Inhibition of Adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953.
- Rountree CB, et al** (2008). Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyl-transferase 1A-deficient mice. *Hepatology* 47: 1288-1297.
- Rubinfeld B, et al** (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792.
- Sakanaka C, et al** (1999). Casein kinase I ϵ in the wnt pathway: Regulation of b-catenin function. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12548-12552.

- Sánchez-Barriga JJ** (2012). Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gaceta Médica de México* 148: 42-51
- Satoh S, et al** (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24: 245-250.
- Schwarz A & J Melendez** (2011). Cancer Stem Cells. *Revista de Investigación Clínica* 63(2): 179-186.
- Secretaría de Salud (2014). Programa de Acción Específico. Prevención y control del cáncer de la mujer 2013-2018. México. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/programa-de-accion-especifico-prevencion-y-control-del-cancer-de-la-mujer-2013-2018-9275>
- Segditsas S & I Tomilson** (2006). Colorectal cáncer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25: 7531-7537.
- Sell S** (2004). Stem Cell Origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51: 1-28.
- Sepúlveda J** (2012). Texto Atlas de Histología, Biología Celular y Tisular. McGraw Hill, México, p 312.
- Shinohara A, et al** (2001). Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 82(3): 450-455.
- Silva, A** (s.f.). Células Madre del Cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, Madrid España. Recuperado el 4 de noviembre de 2018 de: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/945/933>.
- Singh S, et al** (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.
- Sominsky S, et al** (2014). HPV 16 E6 and E6AP differentially cooperate to stimulate or augment Wnt signalling. *Virology* 468-470: 510-523.
- Stamos JL, et al** (2014). Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *eLife* 3, e01998.
- Strovel ET, et al** (2000). Protein phosphatase 2C alpha dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 275: 2399–2403.
- Tauriello D, et al** (2012). Wnt/b-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E812–E820.
- The National Academies** (s.f.). Understanding Stem Cells, recuperado de: [dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/booklets/Understanding_Stem_Cells.pdf](https://www.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/booklets/Understanding_Stem_Cells.pdf) el 4 de nov 2018.
- Thiery JP, et al** (2009). Epithelial-mesenchymal transition in development and disease. *Cell* 139(5): 871-890.

- Till JE & EA McCulloch** (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-222
- Toledo-Guzmán ME, et al** (2018). Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells* 10(12): 183-195.
- Turdo A et al** (2019). Meeting the challenge of targeting cancer stem cells. *Frontiers in Cell and Dev Biology* 7(16): 1-16.
- Uchida N, et al** (2000). Direct Isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14720-14725.
- Uematsu K, et al** (2003). Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 22:7218-7221.
- Vargas-Hernández VM et al** (2015). Detección primaria del cáncer cervicouterino. *Cirugía y Cirujanos* 83(5): 448-453.
- Vermeulen L, et al** (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biol* 12: 468-476 (doi:10.1038/ncb2048)
- Wei W, et al** (2009). Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 8: 76.
- Wicha M, et al** (2006). Cancer Stem Cells: An old idea – A Paradigm Shift. *Cancer Res.* 66: 1883-1890.
- Willert K, et al** (2003). Wnt proteins are lipid-modified and act as stem cells growth factors. *Nature* 423: 448-452.
- Willert K & K Jones** (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20:1394-1404.
- Wodarz A & R Nusse** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 59-88.
- Wodarz A & C Gonzalez** (2006). Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell* 124(6): 1121-1123.
- Wu G, et al** (2003). Structure of b-TrCP-Skp1_b_catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(b-TrCP) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 11:1445-1456.
- Wu Z-Q, et al** (2012) . Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16654–16659.
- Xi He** (2003). A Wnt-Wnt situation. *Dev Cell* 4: 791-797.
- Xing Y, et al** (2003). Crystal structure of a b-catenin/Axin complex suggests a mechanism for the b-catenin destruction complex. *Genes Dev* 17:2753-2764.

- Yang H, et al** (2006). Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinic-pathological data. *BMC Cancer* 6:212.
- Yang ZF, et al** (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13: 153-166.
- Zeng X, et al** (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438: 873-877.
- Zhang Y, et al** (2008). A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nat Genet* 40:862-870.
- Zhan T, Rindtorff N & M Boutros** (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36: 1461-1473.