



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MAMDC2 y PIEZO2 como posibles marcadores tumorales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Axel García Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Antonieta Chávez González
[Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dra. Martha Robles Flores
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Abril, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

ÍNDICE DE ABREVIACIONES	II
RESUMEN	III
ANTECEDENTES	4
CÁNCER	4
BIOLOGÍA DEL CÁNCER	5
CÉLULAS TRONCALES SOMÁTICAS Y CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER	8
MARCADORES TUMORALES	11
<i>MAMDC2</i>	18
<i>PIEZO2</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
• OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES	25
• ENRIQUECIMIENTO EN FENOTIPOS TRONCALES	26
• ENSAYO ALDEFLUOR	28
• ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE <i>MAMDC2</i> Y <i>PIEZO2</i>	29
• <i>Extracción de RNA con Trizol</i>	29
• <i>Síntesis de cDNA</i>	30
• <i>PCR punto final</i>	31
• <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	32
• <i>RT-qPCR</i>	32
• <i>Análisis con Enrichr</i>	35
RESULTADOS	36
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	62

Índice de abreviaciones

°C	Grados Celsius
μL	microlitros
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
cDNA	DNA complementario
CSC	Célula Troncal de Cáncer (<i>del inglés Cancer Stem Cell</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>del inglés Deoxyribonucleic Acid</i>)
FACS	Separación de células activadas por fluorescencia (<i>del inglés Fluorescent Activated Cell Sorting</i>)
kDa	Kilo Daltons
HPV	Virus del Papiloma Humano (<i>del inglés Human Papillomavirus</i>)
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LSC	Células Troncales Leucémicas (<i>del inglés Leukemic Stem Cells</i>)
ml	mililitros
MON	Médula Ósea Normal
mRNA	RNA mensajero
PBS	Solución Buffer de Fosfatos (<i>del inglés Phosphate Buffered Saline</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>del inglés Ribonucleic Acid</i>)
SC	Célula Troncal (<i>del inglés Stem Cell</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
TPM	Transcritos por millón (<i>del inglés Transcripts Per Million</i>)

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, que lo sitúan como uno de los problemas primordiales en materia de salud pública. Solamente al año se reportan más de 14 millones de nuevos casos y cerca de 9 millones de muertes (Heymach, et al., 2018; Bray, et al., 2018; GLOBOCAN, 2020).

La línea de investigación de las células troncales (SC, del inglés *Stem Cells*) ha sido ampliamente explorada a partir de que el grupo de John Dick reportara la existencia de células con inmunofenotipo troncal en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) (Lapidot, et al., 1994; Bhatia, et al., 1997). A partir de este hallazgo, otros grupos reportaron la existencia de células que tienen la capacidad de autorrenovarse y recapitular el fenotipo tumoral en modelos de cáncer de mama (Al-Hajj, et al., 2003) y glioblastoma (Singh, et al., 2004) entre otros (Visvader, 2011).

No obstante, a pesar de los enormes esfuerzos por identificar a las células responsables de originar y mantener los tumores, a la fecha no existe un marcador para células troncales de cáncer por lo que el análisis de los fenotipos asociados a la troncalidad en cáncer sigue siendo un tema de gran interés.

En este trabajo nos hemos enfocado en analizar la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* en diferentes líneas celulares tumorales (tanto en población total como en fracciones enriquecidas con inmunofenotipo troncal) utilizando el aislamiento y purificación de las distintas poblaciones mediante citometría de flujo para posteriormente analizar la expresión de estos marcadores mediante qPCR.

Aunque la presencia de estas dos moléculas de membrana ha sido descrita en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) (Avilés-Vázquez, et al., 2017), cáncer gástrico (*MAMDC2*) y glioma (*PIEZO2*) (Wang, et al., 2016; Yang, 2016), nuestro interés principal fue determinar si al igual que en los modelos mencionados, estas moléculas tienen una expresión diferente entre las fracciones celulares de distintos tipos tumorales, de manera que pudieran tener un potencial uso como marcadores selectivos de SC de cáncer (CSC).

Antecedentes

Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en un sitio específico; se presenta cuando existen fallas en los mecanismos que regulan la proliferación celular, lo que ocasiona un aumento anormal en la cantidad de células en un proceso denominado oncogénesis o tumorigénesis (Lodish, 2016) y que además son capaces de invadir otros tejidos en un proceso denominado metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011; Boffetta, 2014). Esta patología representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la tercera causa de muerte en México (Aldaco-Sarvide, et al., 2018; GLOBOCAN, 2020; Bray, et al., 2018). Se pronostica que para el 2030 la incidencia aumentará a más de 21 millones de nuevos casos y más de 13 millones de muertes anuales (Heymach, et al., 2018).

En México, los tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad son carcinomas en sitios como el colon, mama, pulmón, próstata y cérvix, entre otros (figura 1).

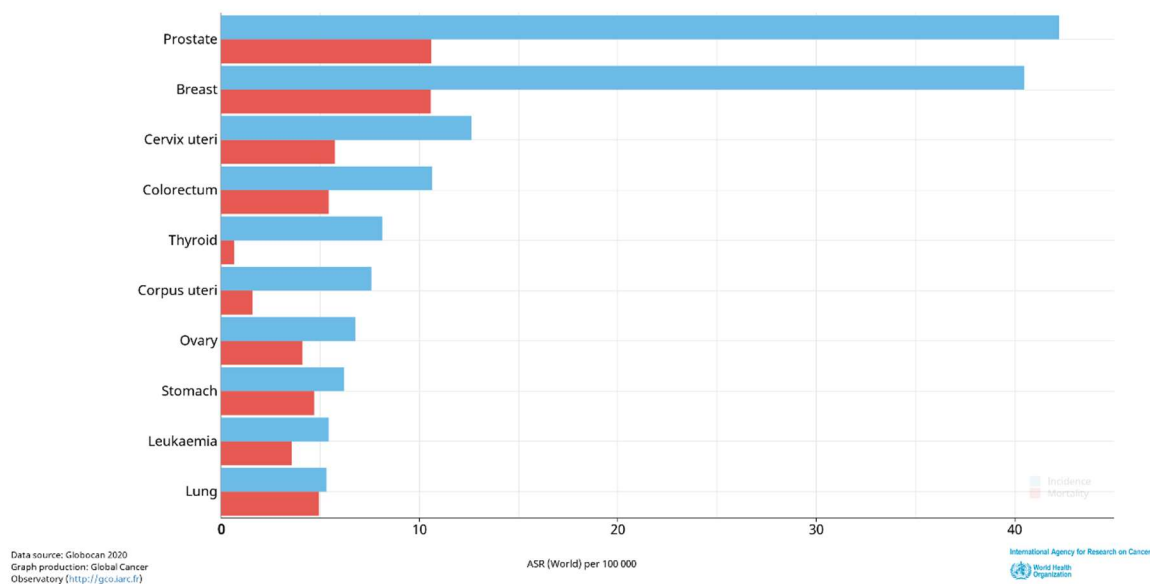


Figura 1. Tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad en la población mexicana. Incidencia, líneas azules, mortalidad, líneas rojas. (GLOBOCAN, 2020).

Debido a esto, resulta de gran importancia realizar investigación que permita entender aspectos importantes sobre su biología; por ejemplo: cómo se origina, mantiene y evoluciona.

Biología del cáncer

Las células que conforman todos los tejidos del cuerpo están sujetos a una constante renovación que tiene como estrategia la proliferación de nuevas células para reemplazar a las existentes al momento de su muerte. Esta tasa de renovación celular varía entre los distintos tejidos de acuerdo con el tiempo durante el cual las células permanecen funcionales, algunas pueden durar largos periodos de tiempo e inclusive durante toda la vida de un organismo. Así, cuando estos mecanismos que mantienen las tasas de crecimiento normal de las células se alteran, causan una división celular excesiva (Lodish, 2016). En la aparición del cáncer están implicadas las mutaciones de dos amplias clases de genes: los protooncogenes, que promueven el crecimiento; y los genes supresores de tumores, que se encargan de controlar la división celular de manera adecuada (Weinberg, 2014), una desregulación en esta clase de genes permiten que las células se dividan de manera descontrolada evadiendo mecanismos de control y muerte.

Se ha demostrado que los tumores de diferentes pacientes son heterogéneos en términos de morfología, marcadores de superficie, mutaciones, proliferación y respuesta a la terapia, sin embargo, se ha observado que, en un mismo tumor a pesar de que las células comparten características que reflejan su origen clonal, también existen variaciones genéticas y epigenéticas entre las diferentes células o locaciones del tumor (Dick, 2009). Adicionalmente, estas células interactúan entre ellas y también con células que forman parte del microambiente tumoral que comúnmente les confiere ventajas en su supervivencia y crecimiento (Blanpain, 2013)

Se han propuesto diferentes modelos para explicar la heterogeneidad celular de los tumores y actualmente prevalecen dos teorías: el modelo clonal (también llamado estocástico) y el modelo de las células troncales de cáncer o modelo jerárquico (Akbari-Birgani, et al., 2016); Shackleton, et al., 2009; Koren & Fuchs, 2016).

El modelo estocástico establece que las células de un tumor son equipotentes, es decir, tienen la misma capacidad de adquirir las características necesarias para renovarse y diferenciarse dando lugar a la variedad de células existentes en el tejido y se resalta que cualquier diferencia funcional entre las células se debe a factores intrínsecos (como niveles en factores de transcripción y activación de vías de señalización) o extrínsecos (la mencionada interacción con otras células del microambiente o factores propios del individuo como la respuesta inmune) (Dick, 2009).

Por otro lado, el modelo jerárquico establece que solo una célula denominada célula troncal de cáncer (CSC, del inglés *Cáncer Stem Cell*) es la responsable del mantenimiento del tumor (Koren & Fuchs, 2016) (Figura 2).

Se ha propuesto que para que una célula pueda ser considerada como troncal debe de contar con diferentes características entre las que se encuentran estar en un estado indiferenciado, la senescencia, expresión de marcadores de superficie y activación de ciertas vías de señalización y de genes reguladores, sin embargo, debido a que algunas de estas características son variables entre las distintas poblaciones celulares e inclusive algunas no son exclusivas, no son determinantes para definir si una célula es troncal; en general, los dos criterios determinantes para definir la troncalidad son la capacidad de autorrenovación y diferenciación.

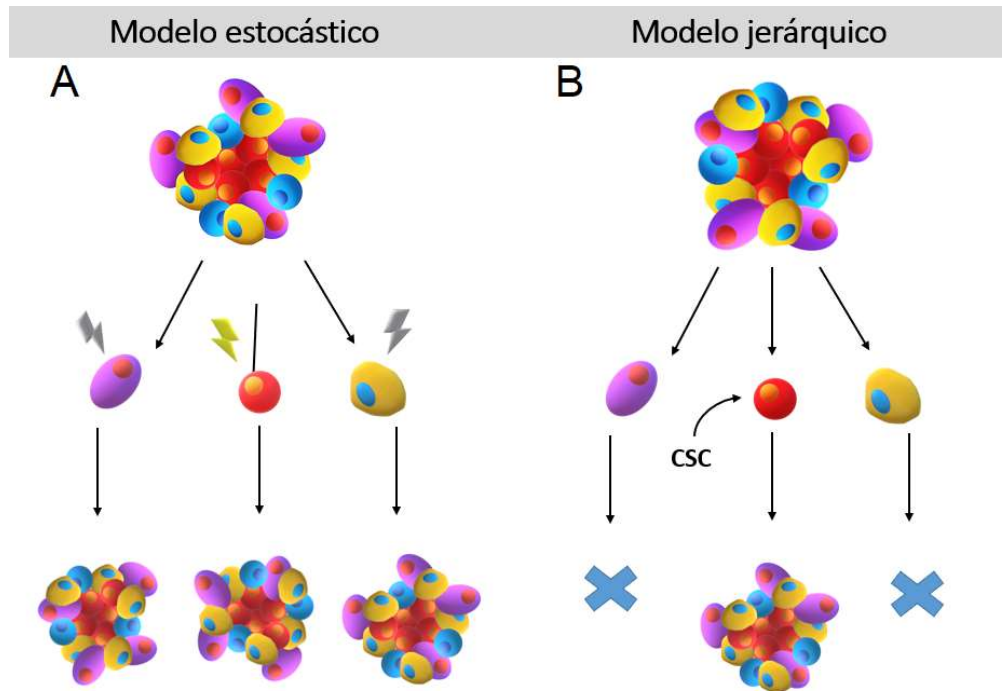


Figura 2. Modelos de crecimiento tumoral. El modelo estocástico (A) dice que todas las células son equipotentes y son procesos aleatorios los que determinan su proliferación y renovación. El modelo jerárquico (B) establece que solo una población de células troncales cancerosas tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en los diferentes tipos celulares que conforman el tumor. Modificada de (Koren & Fuchs, 2016).

El modelo jerárquico ha llamado la atención de diversos grupos científicos de investigación en cáncer debido a la evidencia que apunta a la existencia de una célula troncal responsable del mantenimiento de la enfermedad y la señalan como la causante de la recaída de la enfermedad al no poder ser eliminada por los métodos terapéuticos actuales. A pesar de que en el modelo estocástico sí se contempla una célula con funcionalidad troncal, la diferencia con el modelo de las CSC es que cualquier célula tumoral, bajo determinadas influencias, puede comportarse como una célula troncal de cáncer (Clarke & Becker, 2006; Dick, 2009). Adicionalmente, el modelo de jerárquico ha sido mayormente contemplado actualmente como adecuado ya que para la mayoría de los tumores se ha reportado la existencia de CSC (Clevers, 2011; Singh, et. al., 2014).

Células troncales somáticas y células troncales de cáncer

Las células troncales somáticas son un grupo celular numéricamente reducido, que residen en nichos específicos y altamente especializados, tienen diferentes potenciales de diferenciación y son capaces de regular la homeostasis tisular a través de la generación de nuevas células que reemplazan a aquellas que han llegado al final de su vida funcional. Cada tejido tiene su propia población de células troncales capaces de producir todas las células de linaje específico para dicho tejido (Lodish, 2016).

Así mismo, conforme una célula troncal somática se divide, da origen a diferentes subpoblaciones con diferentes potenciales de diferenciación y madurez.

Un ejemplo claro de este proceso de proliferación y diferenciación es el sistema hematopoyético, donde las células troncales hematopoyéticas (CTH) que se encuentran en la médula ósea, dan origen a las células progenitoras, quienes a su vez dan lugar a las células precursoras hasta llegar finalmente a las células maduras que conforman el tejido sanguíneo.

En la década de 1990 los estudios pioneros del grupo de John Dick demostraron la existencia de una población de células con inmunofenotipo troncal CD34⁺, CD38⁻, Lin⁻ provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) que tenían capacidad de injerto en ratones inmunodeficientes y que recapitulaban la enfermedad en estos animales con el mismo fenotipo del paciente del que provenían (Lapidot, et al., 1994; Bhatia, et al., 1997).

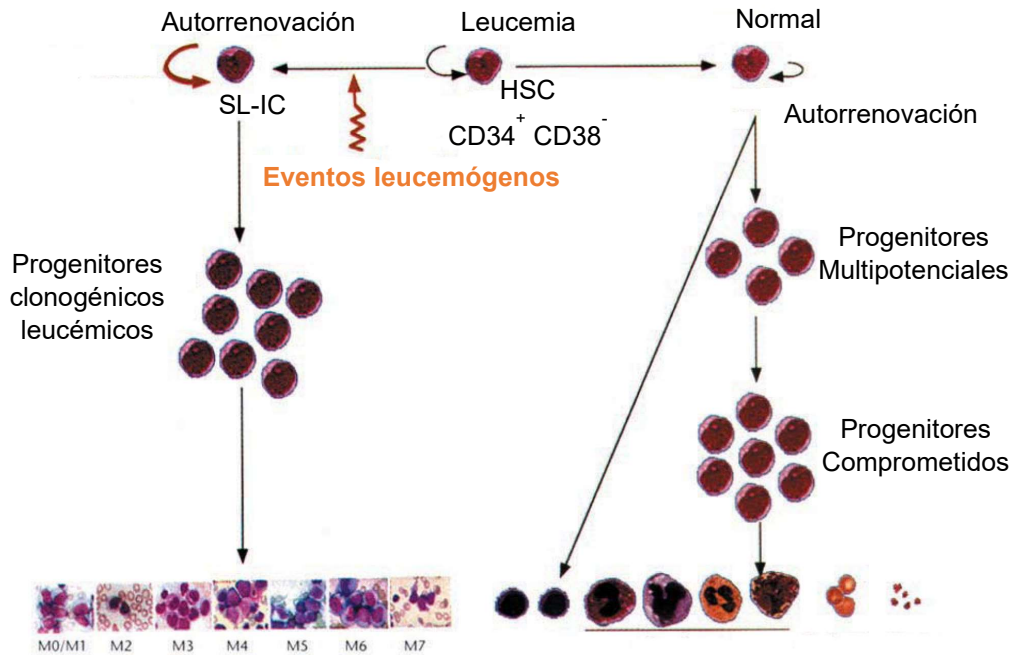


Figura 3. Modelo de las LSC, o modelo jerárquico. Una célula troncal de tejido hematopoyético da origen a los diferentes linajes celulares de dicho tejido. Cuando una célula troncal se transforma, da lugar a células leucémicas que pueden autorrenovarse y recapitular la enfermedad. Modificado de (Bonnet & Dick, 1997).

Se propuso entonces un modelo de tumorigénesis que señalaba a las células troncales leucémicas (LSC, del inglés *Leukemic Stem Cells*) como las responsables de la progresión y mantenimiento de la enfermedad (figura 3).

Posteriormente se reportó también la existencia de células con las mismas capacidades en otros tipos de cáncer como mama (Al-Hajj, et al., 2003) y glioblastoma (Singh, et al., 2004). A dichas células se les denominó células troncales de cáncer y actualmente existe evidencia que demuestra que en la mayoría de los tumores se presentan poblaciones celulares que poseen esta capacidad de injerto recapitulando la formación del tumor original, presentan autorrenovación al hacer xenotrasplantes seriados y diferenciación a los diferentes linajes del tejido (Blanpain, 2013; Visvader, 2011; Singh, et al., 2014).

Actualmente se ha propuesto que las CSC también son responsables de la recaída y metástasis debido a que, además de la capacidad de autorrenovación y multipotencialidad, presentan diversos mecanismos de resistencia a la terapia promoviendo la selección de clonas más malignas (Bakhshinyan, et. al., 2018; Clevers, 2011; Dick, 2009; Singh, et. al., 2014).

El estado actual de la investigación en células troncales es extenso a partir de que fueron observadas por primera vez en los años 90s, ya que desde entonces se ha tratado de ampliar nuestro conocimiento acerca de su biología y las implicaciones que tienen estas en la progresión del cáncer. Así, se ha descubierto que las CSC no solo tienen la capacidad de autorrenovarse y dividirse de forma simétrica para mantener una población de células indiferenciadas que progresivamente generan estados de menor diferenciación en los tumores lo que los vuelve más agresivos (Najafi, et al., 2019), sino que, además, pueden acumular otras características como la llamada transición epitelio-mesénquima (EMT), que también se relaciona con estados no diferenciados de células que pueden colonizar otros tejidos lejos del tumor a través de extravasación (metástasis) (Hanahan & Weinberg, 2011; Najafi, et al., 2019; Kuşoğlu & Avci, 2019).

También juegan un papel muy importante en la regulación del microambiente tumoral y su relación con el nicho ha sido cada vez mejor identificada como un problema importante tanto en su mantenimiento como en su eliminación (Kuşoğlu & Avci, 2019). De igual manera se sabe las CSC pueden originarse en células ubicadas en diferentes escalones de la jerarquía, como células progenitoras como es el caso del cáncer de mama, precursoras como se da en meduloblastomas y carcinomas basales, o inclusive células diferenciadas que inician tumores por mecanismos autónomos no celulares que involucran inflamación, comúnmente por la expresión de ciertos factores como MEK en el caso de epidermis o la señal oncogénica *KRas* inducida por insulina en células acinares en el adenocarcinoma ductal de páncreas (Blanpain, 2013; Visvader, 2011).

Todas estas características en conjunto representan sin duda un gran avance en el conocimiento que se tiene acerca de la biología del cáncer y ha servido para

aproximarnos a mejores estrategias que nos permitan identificarlas y eliminarlas. Hoy en día se ha enfatizado en que las terapias deben estar dirigidas de manera personalizada desde un punto de vista genómico para cada tumor atacando no solo las CSC sino el resto de las células cancerosas (Kuşoğlu & Avci, 2019).

Marcadores tumorales

Para la identificación de células troncales se han utilizado diferentes marcadores que pueden estar asociados a un fenotipo o a una característica funcional. Estos marcadores son diferentes para cada tipo de tejido, es decir, las células troncales de cada tejido tienen un inmunofenotipo diferente. Sin embargo, en cáncer, un problema que permanece constante es el de encontrar marcadores que nos permitan identificar selectivamente las CSC de su contraparte normal; ya que el inmunofenotipo descrito para células troncales de un tejido es el mismo para un tumor que para el tejido normal, es decir, no es posible determinar si las células son cancerosas o no, ya que ambas han mostrado tener capacidad de autorrenovación y multidiferenciación (Clarke & Becker, 2006; Reya, et. al., 2001).

Ejemplo de lo anterior es nuevamente el sistema hematopoyético, que ha servido como un modelo que ha sentado las bases del estudio en células troncales, en donde se ha demostrado que las células troncales tanto normales como leucémicas presentan el mismo inmunofenotipo CD34⁺, CD38⁻, Lin⁻ (Dick, 2009).

Con el objetivo de estudiar las propiedades de las CSC así como encontrar diferentes terapias que nos ayuden a eliminarlas, diversos autores han definido fenotipos específicos para asilar células troncales en otros tejidos, se han empleado diversos marcadores de superficie entre los que se encuentran CD20, CD24, CD44, CD90, CD117, CD133, ALDH, etc. (Akbari-Birgani, et al., 2016; Al-Hajj, et al., 2003; Singh, et al., 2014). Algunos de los marcadores más comunes son descritos a continuación debido a que son los que se utilizarán en el presente trabajo:

- **CD24**

Es una proteína de membrana de 8 kD codificada en el cromosoma 6, altamente glucosilada que interviene en diversas funciones de interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Es expresada de forma normal en células hematopoyéticas incluyendo linfocitos B, células T, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y macrófagos, así como en otras células no hematopoyéticas como células neurales, ganglionares, epiteliales, musculares, de páncreas y queratinocitos (Fang, et al., 2010). De manera general tiende a ser expresada en mayor nivel por células progenitoras y metabólicas activas y en menor medida en células terminalmente diferenciadas (Fang, et al., 2010; Jaggupilli & Elkord, 2012).

La función de CD24 no se entiende del todo para la mayoría de los tejidos, sin embargo, se ha caracterizado su papel en diversas funciones inmunológicas, por ejemplo, funciona como co-estimulador para la expansión clonal de células T CD4⁺ y se ha reportado que es necesaria para el desarrollo y maduración de linfocitos B en médula ósea (Fang, et al., 2010).

CD24 es blanco de múltiples glucosilaciones que son variables de acuerdo con el tipo celular que lo hacen tener diferentes ligandos y diferentes funciones fisiológicas dependiendo del tipo celular donde se exprese (Fang, et al., 2010). En cáncer se describió que células CD24⁻ se asocia a un fenotipo troncal en cáncer de mama (Al-Hajj, et al., 2003) y posteriormente fue definido como marcador de CSC en carcinoma de pulmón y páncreas (Wang, et al., 2018) y recientemente se reportó que en cáncer de mama y ovario juega un papel importante en donde actúa como un punto de control al evadir la respuesta inmune tumoral cuando se une a Siglec-10, el cual es altamente expresado en los macrófagos asociados a tumor, inhibiendo su activación (Barkal, et al., 2019).

A pesar de que ha sido definido como marcador de CSC en diferentes tumores, su función en estas células aún no es comprendido claramente. Una de sus funciones mejor conocidas es su unión a P-selectina; las células que presentan CD24 se unen a células endoteliales que presentan P-selectina, lo cual facilita su diseminación a través del endotelio (Tarhriz, et al., 2019)

- **CD44**

Es una glucoproteína transmembranal y multiestructural altamente conservada que en humanos se encuentra en el cromosoma 11 (Wang, et al., 2018).

El gen que la codifica contiene 20 exones, 9 de los cuales son exones variables que dan lugar a dos familias diferentes de la proteína, las que contienen exones variables y la que no los presenta, todas las isoformas de la proteína tienen funciones variadas, por ejemplo, el exón v3 tiene un sitio heparina-sulfato el cual permite unirse a factores de crecimiento con este dominio como factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs del inglés *Fibroblast growth factors*) y el exón v8 es capaz de interactuar y estabilizar transportadores de cisteína-glutamato, promoviendo la introducción de cisteína para facilitar la síntesis de glutatión (principal antioxidante intracelular) (Ishimoto, et al., 2011; Wang, et al., 2018). Clínicamente, la presencia de ambas formas, tanto las variables como la estándar ha sido usada como marcador de CSC dependiendo el tipo de cáncer (Zhang, et al., 2019). La forma estándar CD44 que carece de exones variables es expresada por la mayoría de las células de vertebrados, participa en interacciones célula-célula, adhesión y migración, así como, censar y responder a cambios en el microambiente tisular (Wang, et al., 2018). Su ligando principal es el ácido hialurónico; al unirse con éste presenta diferentes funciones como la remodelación de citoesqueleto de actina, la motilidad celular, migración y regulación del proceso de transición epitelio-mesénquima (Yan, et al., 2015).

La presencia de CD44 es necesaria para la integración de señales del microambiente en las que actúa como regulador transcripcional de genes implicados en funciones como autorrenovación, protección contra apoptosis y estrés oxidante, tales como ciclina-D1, MMP-9, HIF-2 α , c-myc y Twist1 (Yan, et al., 2015; Wang, et al., 2018). Inicialmente fue descrita como marcador de células troncales de cáncer de mama en combinación con la ausencia del marcador CD24 (Al-Hajj, et al., 2003) y posteriormente como marcador de células troncales en cáncer gástrico (Takaishi, et al., 2009).

Desde entonces es comúnmente utilizado, solo o en combinación con otros marcadores como, por ejemplo, CD24, CD34, CD133, cMet, para aislar o enriquecer células troncales de varios tipos de tumores como gástrico, colon, mama y cabeza y cuello (Wang, et al., 2018).

- **CD133**

Es una glucoproteína con cinco dominios transmembranales codificada por el gen prominina-1 (PROM-1) en el cromosoma 4 en humanos. Puede ser regulada por diferentes promotores, lo que da lugar a dos diferentes proteínas que varían por la exclusión de un exón de 27 nucleótidos, ambas con múltiples sitios de glucosilación (Ren, et al., 2013; Glumac & LeBeau, 2018). Su función fisiológica específica no se ha determinado claramente, sin embargo, se sabe que en su dominio intracelular se une a colesterol y esto podría estar involucrado en la activación de vías de señalización (Jang, et al., 2017; Glumac & LeBeau, 2018) como la organización de la membrana plasmática en células epiteliales y la regulación de la apoptosis (Mak, et al., 2014);

La expresión de CD133 fue inicialmente descrita en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (Yin, et al., 1997), y más recientemente se conoce que es expresada en hígado fetal humano y en células troncales neurales y de próstata (Glumac & LeBeau, 2018).

En células troncales de cáncer han sido reportados numerosos estudios que indican que CD133 es un marcador que se utiliza para aislarlas en combinación con otros marcadores, en una variedad de tumores como cerebro, colon, hígado, páncreas, riñón, pulmón, endometrio, ovario y hueso (Ren, et al., 2013; Jang, et al., 2017; Gopalan, et al., 2018) y se ha reportado que en células de neuroblastoma suprime la diferenciación modificando vías de señalización como RET (Takenobu, et al., 2011).

- **ALDH1**

Las aldehído deshidrogenasas (ALDH) son una familia de enzimas polimórficas que catalizan la oxidación de varios sustratos aldehído endógenos a su correspondiente ácido carboxílico y la conversión de retinol en ácido retinoico (Mele, et al., 2018). El genoma humano codifica para 19 genes de ALDH que se encargan de la desintoxicación producida por aldehídos producto de procesos metabólicos fisiológicos, agentes externos y moléculas citotóxicas, por lo que la actividad incrementada de ALDH confiere mayor protección contra agentes quimioterapéuticos (Tirino, et al., 2013).

La isoforma ALDH1A1 es a la que se le ha atribuido principalmente las funciones de desintoxicación y oxidación de retinol y está distribuida de forma ubicua en diferentes órganos como cerebro, testículos, riñón, ojo (retina), hígado y pulmones (Tomita, et al., 2016). Se ha demostrado que la familia ALDH1 que contiene las isoformas ALDH1A1, ALDH1A2 y ALDH1A3 están particularmente activas en células troncales normales que incluyen: células hematopoyéticas, neurales, células miogénicas, de próstata, de criptas intestinales, hígado y páncreas en donde sus funciones pueden estar implicadas en procesos como autorrenovación, diferenciación y expansión de estos tipos celulares (Tomita, et al., 2016; Mele, et al., 2018). Sin embargo, los mecanismos específicos involucrados en su regulación aún no están del todo comprendidos (Tomita, et al., 2016).

Fue Hilton (1984) quien por primera vez describió la resistencia de células leucémicas a los agentes citotóxicos alquilantes por la actividad ALDH y se ha demostrado que las células troncales de algunos tipos de cáncer como hígado, pulmón, mama, colon y de cabeza y cuello presentan una alta actividad de ALDH (Mele, et al., 2018).

Cabe destacar que la utilización de marcadores para la separación de CSC han sido descritas en su mayoría en modelos in vivo mediante la utilización de xenotrasplantes para evaluar su funcionalidad troncal, sin embargo, este modelo presenta una variabilidad inherente causada por ciertos factores como la compatibilidad entre especies, así como la proporción de células presentes de

acuerdo con los marcadores utilizados para su separación (Dick, 2009). Existen otros modelos, como los cultivos en 3D (también llamados cultivos de esferas) que han sido utilizados como una alternativa para el estudio de CSC *in vitro*.

Para los propósitos de este trabajo se describieron solo los marcadores que fueron utilizados para su desarrollo con base en su utilidad en la separación de CSC de acuerdo con lo ya reportado en la literatura, sin embargo, es importante mencionar que existen otros marcadores hasta ahora reportados para células troncales tumorales de diferentes tejidos que se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Marcadores de CSC reportados de acuerdo con su expresión en diferentes tumores. Modificado de (Koren & Fuchs, 2016).

Marcador	Cáncer reportado	Referencias
ABCB5	Melanoma Colorrectal	(Schatton et al., 2008; Wilson et al., 2011)
CD20	Melanoma	(Fang et al., 2005)
CD24	Mama (ausente) Páncreas Estómago Pulmón	(Al-Hajj et al., 2003; Kristiansen et al., 2003; Zhang et al., 2011a)
CD34	Hematológicos	(Krause et al., 1994; Lapidot et al., 1994)
CD38	Hematológicos - LMA (ausente)	(Lapidot et al., 1994)
CD44	Páncreas Cabeza y cuello Estómago Colorrectal Próstata Ovario	(Al-Hajj et al., 2003; Cannistra et al., 1995; Li et al., 2009; Liu et al., 1999; Prince et al., 2007; Takaishi et al., 2009; Wielenga et al., 1993)
CD90	Hígado Cerebro	(He et al., 2012; Yang et al., 2008)
CD117/KIT	Ovario Gastrointestinal estromal	(Sarlomo-Rikala et al., 1998; Zhang et al., 2008)
CD133	Colorrectal Hígado Cerebro Pulmón Ovario Próstata	(Bertolini et al., 2009; Curley et al., 2009; Eramo et al., 2008; Ferrandina et al., 2008; Liu et al., 2006a; Yin et al., 2007)

Tabla1 (continuación)

CXCR4	Páncreas Mama Pulmón Próstata	(Hermann et al., 2007; Kucia et al., 2005; Smith et al., 2004; Wang et al., 2013)
EpCAM	Colorrectal Mama Páncreas	(Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007; de Boer et al., 1999; Li et al., 2009)
LGR5	Colorrectal	(Barker et al., 2009)
ALDH1	Cérvix Colorrectal Mama	(Ginestier, et al., 2007) (Huang, et al., 2009) (Yao, et al., 2015)

Si bien es cierto que el tipo de marcadores asociados a troncalidad en diferentes tumores es tan heterogéneo como los tumores mismos, también es cierto que hasta este momento no ha sido posible encontrar ninguna molécula que permita identificar con precisión a las células troncales tumorales o distinguir a estas poblaciones de las células troncales no tumorales que también pueden encontrarse dentro de la heterogeneidad del tumor. A la fecha existen solo algunos reportes donde se identifica a células troncales leucémicas con marcadores como CD26 y IL1RAP (Landberg, et al., 2016), sin embargo, en tumores sólidos la mayoría de los inmunofenotipos descritos para CSC es el mismo que para SC.

En ese sentido, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que las células troncales de LMC presentan niveles incrementados de las moléculas de superficie *MAMDC2* y *PIEZO2* (Avilés-Vázquez, et al., 2017). Este estudio es el primero que ha relacionado entonces la posible presencia específica de estos marcadores en CSC. Debido a que las células troncales representan menos del 1% de la población de un tumor (Dick, 2009; Akbari-Birgani, et al., 2016) no se ha relacionado su actividad con este tipo de células. Recientemente se ha reportado su presencia en diferentes tumores sólidos, sin embargo, el papel que juegan estas moléculas apenas se está explorando.

MAMDC2

También denominado MDGA1, es una proteína que contiene un dominio MAM, cuyo nombre se deriva de las proteínas **M**eprina/proteína **A**5/PTP**m**u (Proteína Tirosina Fosfatasa), dominio conservado que se encuentra en múltiples proteínas de superficie. Es una proteína de 686 aminoácidos que contiene una secuencia N-terminal seguida de 4 dominios MAM consecutivos. Pertenece a una superfamilia de inmunoglobulinas que están clasificadas como moléculas de adhesión celular, así como regulador en el crecimiento axonal y desarrollo de sinapsis inhibitorias (Litwack, et al., 2004).

En cáncer se ha descrito su papel como gen supresor de tumor en cáncer gástrico inhibiendo la proliferación al suprimir las fases del ciclo celular G1-S, además de que el promotor de *MAMDC2* se encuentra hipermetilado en el 62% de los casos donde el gen se encuentra silenciado o regulada a la baja lo que se asocia con un mal pronóstico en los pacientes (Wang, et al., 2016). Existe otro reporte que asoció a *MAMDC2* con funciones de motilidad celular en un modelo *in vitro* con células MDCK y en donde se observó promueve la adhesión célula-célula mientras disminuye la adhesión a matriz extracelular ya que su silenciamiento aumentaba la unión con colágena IV (Díaz-López, et al., 2011).

Más recientemente se reportó que MAMD2 tiene un efecto inhibitorio de crecimiento en células de cáncer de mama mediante la regulación de la vía de MAPK (Lee, et al., 2020), sin embargo, específicamente no se ha estudiado en células troncales.

PIEZO2

La familia de proteínas PIEZO son una clase de canales mecánicamente activados mediante presión y éstos están evolucionariamente conservados en animales, plantas y protozoarios.

PIEZO2 es una proteína integral de membrana de un peso molecular de 318 kD y 2752 aminoácidos, puede contener hasta 40 dominios transmembranales, e incluso se ha propuesto que ambos PIEZOs en humanos son las proteínas con más pases transmembranales. Presenta función de mecanotransductor al convertir estímulos

mecánicos en estímulos eléctricos (Ranade, et al., 2015; Bagriantsev, et al., 2014). Presenta una alta expresión en las neuronas sensoriales primarias del ganglio de la raíz dorsal, así como en vejiga, pulmón y colón (Coste, et al., 2010).

De hecho, las proteínas PIEZO han mostrado jugar importantes funciones en todos, o casi todos, los procesos de mecanotransducción, incluyendo en el sentido del tacto, dolor, propiocepción, flujo urinario y distensión de la vejiga, así como regulación de volumen celular y migración (Geng, et al., 2017).

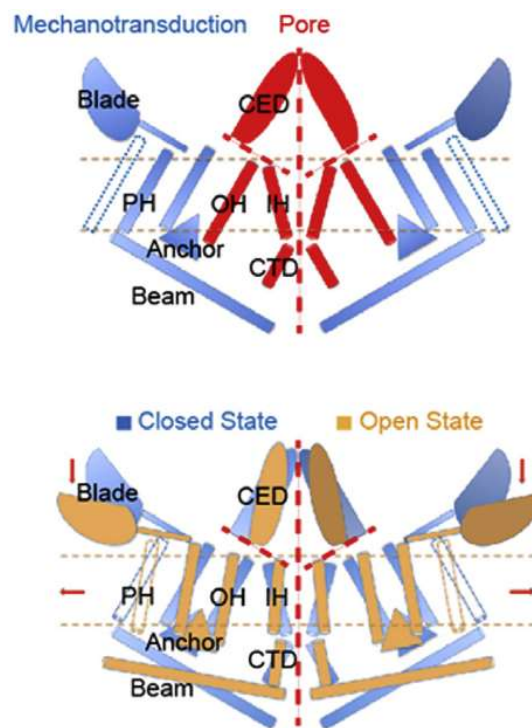


Figura 4. Propuesta de mecanismo de acción de los canales PIEZO. En la imagen superior se muestra un modelo topológico del canal con sus dominios de mecanotransducción (azul) y el poro o canal iónico de Ca^{2+} (rojo). En la figura inferior se muestra el modelo propuesto del mecanismo de acción, el estado cerrado y abierto se muestran en azul y amarillo respectivamente. Se propone que al ejercer presión mecánica (flechas rojas), el dominio mecanotransductor compuesto por “hélices”, modificando la conformación del canal iónico permitiendo el flujo de cationes (línea punteada roja) y así convertir el estímulo mecánico en uno eléctrico. Obtenido de (Geng, et al., 2017) adaptado de (Ge, et al., 2015).

Son pocos los estudios en donde se ha relacionado la función de *PIEZO2* con cáncer, algunos reportes han sugerido que esta molécula regula la angiogénesis tumoral y la permeabilidad vascular de células tumorales de glioma, mediante el eje de señalización $\text{Ca}^+/\text{Wnt11}/\beta\text{-Catenina}$ (Yang, 2016). Además, se ha descrito que su homólogo *PIEZO 1* se encuentra disminuido en cáncer de pulmón donde parece estar asociado con migración celular (Bagriantsev, et al., 2014).

Al igual que para *MAMDC2*, no existen aún reportes en donde se estudie presencia o funcionamiento de *PIEZO2* en células troncales.

Planteamiento del problema

En años recientes se ha propuesto que el origen y permanencia del cáncer se debe a la existencia de una población con características de célula troncal, la cual es capaz de autorrenovarse y mantener el fenotipo de la enfermedad original al tiempo que permite la proliferación del resto de células que conforman el tumor (Clarke & Becker, 2006; Reya, et al., 2001; Visvader, 2011).

La detección de células troncales se ha asociado con la expresión de marcadores de superficie que permiten su seguimiento. Sin embargo, actualmente no hay descrito ningún marcador común que se presente selectivamente en las células troncales de todas las células que conforman el tumor ni de su contraparte normal.

Las moléculas *MAMDC2* (Litwack, et al., 2004) y *PIEZO2* (Bagriantsev, et al., 2014) fueron recientemente descritas como posibles marcadores de LSC de LMC al presentar una sobre-expresión en comparación con SC de MON (Avilés-Vázquez, et al., 2017), por lo que su estudio en otros tipos de tumor permitiría definir si alguna de ellas podría ser utilizado como marcador específico asociado a poblaciones troncales tumorales dada su relación con cáncer y su presencia en membrana que podría significar un potencial uso como marcador de CSC.

Justificación

De acuerdo con información reportada en la literatura, el desarrollo y mantenimiento de diversos tumores parece ajustarse a un modelo jerárquico, en donde una pequeña población es responsable de la permanencia de la enfermedad (Blanpain, 2013; Visvader, 2011; Singh, et al., 2014). Dentro de los principales tipos de tumores que afectan a la población mundial, los cánceres de mama, cervicouterino, pulmón y colon tienen una alta incidencia y mortalidad en la población mexicana (Aldaco-Sarvide, et al., 2018; GLOBOCAN, 2020) y aunque todos ellos parecen asociarse a la presencia de poblaciones troncales, aún existen importantes interrogantes sobre cuál es la proporción de estas células y si existe algún marcador de superficie celular que permita su detección y/o seguimiento.

En este trabajo se decidió evaluar la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* en poblaciones tumorales totales, así como en poblaciones celulares con inmunofenotipo troncal de las líneas MCF-7, H1299, HCT116, HeLa y SiHa, las cuales representan un modelo de estudio sobre los tipos de tumores más prevalentes en nuestra población. Dado el origen diferente de cada una de las líneas, sería importante evaluar la expresión de las moléculas de superficie en células con inmunofenotipo troncal y determinar si existen diferencias en la expresión con respecto a las células de la población total de cada línea.

Hipótesis

MAMDC2 y *PIEZO2* son moléculas cuya expresión se encuentra incrementada en poblaciones con inmunofenotipo troncal (CD34⁺, CD38⁻, Lin⁻) provenientes de LMC, por lo que una o ambas podrían encontrarse sobre expresadas en poblaciones aisladas con inmunofenotipo troncal provenientes de líneas celulares de tumores sólidos, en comparación con la población de células no troncales de las mismas líneas celulares totales.

Al explorar expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* en células con inmunofenotipo troncal de líneas celulares de distintos tipos de tumores se podría encontrar diferencias significativas entre las poblaciones que nos permitan poder definir el uso de estos marcadores y su función en los distintos tipos de cáncer.

Objetivos

General

Determinar la expresión de las moléculas *MAMDC2* y *PIEZO2* en líneas celulares provenientes de diferentes tumores que representan tipos de cáncer de mayor incidencia en México.

Particulares

1. Evaluar la expresión génica de *MAMDC2* y *PIEZO2* en las diferentes líneas celulares de tumores sólidos.
2. Analizar la expresión de marcadores asociados a troncalidad en diferentes líneas celulares provenientes de tumores sólidos.
3. Aislar poblaciones definidas con inmunofenotipo troncal y no troncal en las diferentes líneas celulares y analizar la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*.
4. Analizar si las poblaciones aisladas con inmunofenotipo troncal provenientes de distintos tumores sólidos muestran diferencias en la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* con respecto a las poblaciones consideradas no troncales.

Metodología

- Obtención y cultivo de líneas celulares tumorales

Las líneas celulares provenientes de diferentes tumores sólidos fueron obtenidas mediante donaciones.

Las diferentes líneas celulares fueron mantenidas en condiciones de cultivo específicas para cada una de ellas (tabla 2); y una vez expandidas, fueron retiradas del cultivo y se mantuvieron bajo congelación en nitrógeno líquido con el objetivo de tener un banco de células para su posterior uso. Para la congelación se utilizó Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest) y Dimetilsulfóxido (DMSO) en proporción 9:1.

Al momento de su utilización se descongelaron y fueron mantenidas en cultivo en pasajes no mayores a 15 y con una confluencia de entre el 80 y 90% antes de cada experimento,

Tabla 2. Líneas celulares empleadas con sus características y condiciones de cultivo.

Tejido	Línea	Origen	Patología	Cultivo
Cérvix	HeLa	Epitelial	Adenocarcinoma	RPMI 1640 SFB 10%
	SiHa	Epitelial	Carcinoma escamoso fase II	RPMI 1640 SFB 10%
Colon	HCT116	Epitelial	Carcinoma colorrectal	DMEM SFB 10%
Mama	MCF7	Epitelial	Adenocarcinoma	DMEM F-12 SFB 10%
Pulmón	H1299	Epitelial derivado nódulo linfático	Carcinoma no microcítico	RPMI 1640 SFB 10%

Obtención de células mononucleares normales

Las muestras de Médula Ósea Normal (MON) fueron obtenidas del Hospital General Regional No. 2 Villa Coapa del IMSS. De estas muestras se obtuvieron las células mononucleares de baja densidad ($<1.077\text{g/ml}$), mediante gradiente de Ficoll, Lymphoprep (StemCell Technologies).

Se colocó en un tubo falcon de 50 ml el volumen necesario de Ficoll de acuerdo con la cantidad de la muestra en proporción 1:1, se añadió posteriormente la muestra de médula ósea con una pipeta estéril cuidando siempre que se conservara la interfase entre Ficoll-muestra. El tubo se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y una vez realizado esto, en el tubo se observan tres fases, una superior que contiene el suero, una fase intermedia que corresponde al Ficoll que está separado del suero por una banda que contiene a las células mononucleares y la fase inferior con los demás componentes celulares y plaquetarios que no son células mononucleares. Se recolectó con una micropipeta la banda de mononucleares y fueron resuspendidas en buffer de fosfatos pH 7.2 (PBS) (GIBCO) suplementado con SFB al 3% (Biowest). El número total de células nucleadas y viables se determinó mediante conteo con hemocitómetro y azul tripano 0.4%. La tinción se realizó con 5 μl de azul de tripano y 95 μl de suspensión celular.

- **Enriquecimiento en fenotipos troncales**

Para la detección de poblaciones troncales de las distintas líneas celulares se utilizaron los marcadores asociados a troncalidad en los tejidos de los cuales proviene cada línea anteriormente descritos en antecedentes y que han usado en modelos de estudio tanto *in vivo* como *in vitro* (tabla 3).

A partir de esta información se seleccionó un panel de anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos, se realizó una sola tinción y se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Tabla 3. Marcadores asociados a troncalidad y expresión en cada uno de los tipos de cáncer que se encuentran representados en las líneas celulares del estudio. NA, No aplica (no descrito como marcador en la línea celular); +, marcador que sí ha sido descrito para CSC en la línea celular; (-), marcador reportado que debe estar ausente en el fenotipo considerado como troncal.

	CD24	CD44	CD133	ALDH1
Cérvico uterino	NA	+	NA	+
Colon	+	+	+	+
Mama	(-)	+	+	+
Pulmón	+	+	+	NA

Referencias: (Al-Hajj, et al., 2003; Ginestier, et al., 2007; Huang, et al., 2009; Ebben, et al., 2010; Clevers, 2011; Yao, et al., 2015; Akbari-Birgani, et al., 2016).

Se midió la actividad de ALDH mediante el kit ALDEFLUOR (StemCell Technologies) y se utilizaron los anticuerpos anti-CD24-PECy7, anti-CD44-APC, anti-CD133-BV421 (Biolegend, San Diego, CA, USA).

Inicialmente las líneas celulares totales adherentes, en cultivo con una confluencia máxima de entre 85-90% fueron lavadas con 2 ml de PBS, enseguida se añadieron 2 ml de Tripsina-EDTA (Gibco) y se incubaron durante 5 min. Al cabo de este tiempo las células fueron recuperadas en un tubo falcon de 15 ml que contenía PBS con SFB al 10% y se centrifugaron a una velocidad de 1200 rpm durante 5 min, una vez concluido el tiempo, el sobrenadante fue eliminado y el botón celular se resuspendió en PBS para proceder a realizar el conteo celular en cámara de Neubauer con azul de tripano 0.4%. La tinción se realizó con 10 µl de azul de tripano y 90 µl de suspensión celular.

Un millón de células de cada línea celular fueron resuspendidas en buffer ALDEFLUOR y se colocaron en tubos para citómetro para enseguida realizar la tinción de acuerdo con las instrucciones del proveedor descritas a continuación.

- **Ensayo ALDEFUOR**

Una vez retiradas las células de cultivo, se contaron y se colocaron 1×10^6 células viables en dos tubos para citómetro con 150-200 μL de buffer ALDEFUOR previamente enfriado a 4°C , un tubo se etiquetó como “control” y otro como “tinción”. A cada tubo se añadió 5 μL de reactivo ALDEFUOR, se resuspendió para homogenizar e inmediatamente después se añadieron 5 μL de inhibidor DEAB al tubo “control”. Las células fueron incubadas a 37°C durante 45 min y al cabo de este tiempo se añadió buffer de tinción hasta completar un volumen total de 400-500 μL para proceder a centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. Una vez centrifugadas se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100-150 μL (tinción) o 400 μL (control) de buffer ALDEFUOR a 4°C . A partir de este punto el tubo “control” se almacena a 4°C hasta su análisis en el citómetro y el tubo de “tinción” se usa para la tinción con el panel de anticuerpos antes mencionado.

Una vez concluido el procedimiento de ALDEFUOR se añadió al tubo de tinción 5 μL de una mezcla de anticuerpos que incluía CD24-PECy7, CD44-APC y CD133-BV421, mismos que se incubaron durante 15 min a 4°C . Transcurrido este tiempo, se adicionaron 300 μL de buffer de tinción para enseguida centrifugar a 2000 rpm durante 5 min y así lavar el exceso de anticuerpo. Finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen final de 300-500 μL para su análisis en el citómetro.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences) hasta completar 700,000-800,000 eventos por cada experimento. El procedimiento fue repetido por triplicado bajo las mismas condiciones para cada línea celular. Con este procedimiento se determinó el inmunofenotipo asociado a troncalidad de cada una de las líneas celulares, de acuerdo con la información en la literatura, y la proporción de cada una estas poblaciones.

Este procedimiento se realizó nuevamente para purificar mediante selección por inmunofenotipo a las poblaciones celulares troncales y no troncales en un citómetro de flujo FACSAria Ilu (BD Biosciences) realizar su posterior análisis.

- Análisis de expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*

Para analizar la expresión génica de las moléculas *MAMDC2* y *PIEZO2* se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tanto en punto final como en tiempo real (rt-qPCR).

- Extracción de RNA con Trizol

Las células provenientes de cada línea celular (ambas poblaciones asiladas) fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. Una vez obtenido el botón celular, se agregó el volumen necesario de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con la tabla 4, mismo que se resuspendió de forma suave hasta obtener una mezcla homogénea, la cual fue agitada en vortex durante 15 s y almacenada en ultracongelación a -70°C hasta su posterior procesamiento.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y una vez en estado líquido se les añadió cloroformo grado biología molecular (Sigma) de acuerdo con los volúmenes indicados en la tabla 4. Los tubos Eppendorf se agitaron en vortex durante 15 s, se mantuvieron sin movimiento 3-5 min y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.

Al cabo de este tiempo, se observan tres fases en el tubo: la fase inferior es de color rosa y contiene las proteínas, la interfase contiene el DNA y la fase superior es acuosa y contiene el RNA. La fase acuosa fue recuperada cuidadosamente y depositada en un tubo Eppendorf nuevo al cual se le adicionó isopropanol de acuerdo con los volúmenes indicados en la tabla 4. En el caso de que el número inicial de células lisadas fuera inferior a 100,000 se agregaron 0.5 µl de glucógeno (5 mg/mL)(Invitrogen), posteriormente el tubo se agitó suavemente mediante inversión de 4 a 5 veces y se dejó reposar durante toda la noche a -20°C.

Transcurrida esta etapa se procedió a centrifugar durante 2000 rpm durante 10 min a 4°C para posteriormente retirar la fase líquida con ayuda de una micropipeta y tratando de no resuspender el botón de RNA del fondo del tubo. Las muestras fueron lavadas agregando el volumen necesario de etanol al 75% (ver tabla 4), seguido de una agitación suave para desprender el RNA. Una vez hecho esto, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4°C y nuevamente con ayuda de una micropipeta se retiró todo el etanol del tubo evitando en todo momento tomar o resuspender la muestra. El tubo se dejó abierto durante 3-5 min para permitir la evaporación del etanol remanente y posteriormente resuspender con 25 µL de agua libre de RNasas tratada con DEPC (Roche) y se almacenó en ultracongelación a -70 °C.

Tabla 4. Volúmenes de cada reactivo utilizados durante la extracción de RNA.

Número de células	Volumen de Trizol (µL)	Volumen de cloroformo (µL)	Volumen de isopropanol (µL)	Volumen de etanol (µL)
<1x10⁶	250	50	125	250
1x10⁶ – 5x10⁶	500	100	250	500
>5x10⁶	750	150	375	750

El RNA extraído fue descongelado para analizar su cantidad (utilizando un nanodrop) y calidad (mediante electroforesis en gel de agarosa), para enseguida proceder a realizar síntesis de cDNA.

- **Síntesis de cDNA**

Por cada 10 µL de volumen de reacción se utilizaron 250 ng de RNA extraído. En un tubo Eppendorf de 200 µL se adicionaron 0.5 µL de Random primers (Invitrogen), 0.5 µL de mezcla dNTPs (Invitrogen) y el volumen correspondiente a 250 ng de RNA. Se llevó a un volumen final de 6 µL completando con agua libre de RNasas y el tubo se colocó en el termociclador (BioRad) y se realizó una incubación a 65°C durante 5 min, transcurrido este tiempo se retiró del

termociclador y se añadieron 2 μL de 5X FSB (Invitrogen), 1 μL de DTT 0.1 (Invitrogen) y 0.5 μL de RNase out (Invitrogen). Nuevamente se colocó en el termociclador y se realizó una segunda incubación a 37°C durante 2 min. Finalmente se adicionaron 0.5 μL de la enzima M-MLV-RT (Invitrogen) y se colocó en el termociclador para correr el programa de cDNA.

El cDNA obtenido se utilizó de inmediato para el análisis de PCR punto final o qPCR. En los casos en los que la determinación de PCR no se realizó inmediatamente las muestra fueron almacenadas a -20°C por una semana como máximo.

Todo el procedimiento se realizó para lisados de células de cultivo totales mientras que para el RNA obtenido de las poblaciones de células troncales aisladas mediante sort el análisis cuantitativo de la expresión se realizó mediante qPCR en tiempo real:

- PCR punto final

En un tubo de reacción de 200 μL se preparó un Mezcla maestra con las siguientes cantidades en μL :

Buffer PCR 10X	2.5
MgCl ₂	0.75
Mezcla dNTPs	0.5
Primer forward	0.5
Primer reverse	0.5
Taq DNA Polimerasa	0.1
Agua libre de RNasas	18.15

Una vez preparado la Mezcla maestra se adicionaron 2 μL de cDNA y se corrió el programa correspondiente en el termociclador. El procedimiento y las cantidades de reactivos utilizadas fueron iguales para ambas moléculas (*MAMDC2* y *PIEZO2*) utilizando solamente los primers correspondientes para cada una (tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de primers utilizados para la detección del transcrito de las moléculas MAMDC2 y PIEZO2 mediante PCR punto final.

	Forward	Reverse
PIEZO2	5' GCCCAACAAAGCCAGTTGAA- 3'	5' GGGCTGATGGTCCACAAAGA- 3'
MAMDC2	5' AGAAGCCCATGCCTACCAAG- 3'	5' CAAGAGGCGTGCTTTTTGTC- 3'

Los productos finales de reacción se colocaron en un gel de agarosa para su análisis mediante electroforesis.

- Electroforesis en gel de agarosa

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 0.75 g de agarosa (Roche) y se disolvió con 36.5 ml de TBE 1X (Invitrogen). Para facilitar la solubilización se calentó durante 10-15 s en un microondas y se agitó suavemente el matraz hasta obtener un líquido traslúcido y sin restos de agarosa sólida. La mezcla fue vertida en el molde de la cámara de electroforesis con un peine para permitir la formación de los pocillos y se dejó solidificar durante 15 min. Cuando se solidificó por completo el gel, se llenó la cámara con TBE 1X.

Cada una de las muestras a analizar fue mezclada con 3 µL de mezcla de carga que contiene BlueJuice y Sybr Gold (Invitrogen) al 10 y 2% respectivamente en agua libre de RNasas y 3-6 µL del RNA extraído o del producto de PCR. Una vez cargadas las muestras se realizó el corrimiento electroforético a un voltaje de 65-75 V.

- RT-qPCR

Se utilizó el kit LightCycler® TaqMan® master (Roche) diseñado para el sistema LightCycler® de carrusel y capilares de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Primero se preparó una Mezcla maestra añadiendo 10 µL de enzima a un tubo con mezcla de reacción 5x “hot start”, el cual ya contiene el buffer de reacción, MgCl₂ y la mezcla dNTPs. Una vez preparada la Mezcla maestra, se preparó la

mezcla de PCR, añadiendo la sonda (FAM) y agua libre de RNasas de acuerdo con el número total de reacciones (tabla 6).

Se realizó la carga de los capilares, a los cuales se añadieron 8 μL de mezcla PCR y posteriormente 2 μL de la muestra correspondiente. En todos los corrimientos se utilizaron controles negativos en donde se añadió agua en lugar de muestra.

Tabla 6. Componentes y cantidades para preparación de mezcla PCR.

	1 Rx (μL)
<i>Mezcla maestra</i>	2
<i>Sonda</i>	1
<i>Agua</i>	5
<i>cDNA</i>	2
<i>total</i>	10

Una vez cargados los capilares, se colocaron en sus adaptadores para centrifuga, se centrifugaron a ~ 800 rpm durante ~ 15 s y se insertaron en el carrusel del LightCycler.

Se fijaron las condiciones en el equipo (tabla7) y se procedió con la correspondiente corrida.

Tabla 7. Condiciones de corrida para qPCR en LightCycler.

Programa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Ciclos	Tiempo [hh:mm:ss]
Desnaturalización inicial	90	1	00:10:00
Amplificación	90	45	00:00:10
	65		00:00:59

El procedimiento se realizó para ambas moléculas (*MAMDC2* y *PIEZO2*) y también para el gen constitutivo *GAPDH*. Los datos obtenidos del software del LightCycler® fueron los valores de Ct los cuales se utilizaron para el análisis de expresión de cada molécula, mismo que se realizó mediante el método del delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001).

$\Delta\Delta Ct$

En el método $\Delta\Delta Ct$ se compara la expresión de un gen de interés con la expresión de un gen constitutivo, que en este caso fue *GAPDH* y se realiza una comparación de expresión en dos condiciones distintas, un tratamiento y una referencia. Para este proyecto se tomó como referencia el nivel de expresión en la subpoblación no troncal (NT) ya que representa la mayoría de las células presentes en el cultivo.

Para poder aplicar el método ambos genes deben de presentar por lo menos un valor de Ct, por lo que si no se presenta un valor de expresión (es decir, hay ausencia de expresión) no se podrá utilizar la fórmula.

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gen\ constitutivo}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Tratamiento} - \Delta Ct_{Referencia}$$

Para calcular el *fold change* o diferencia en el nivel de expresión posteriormente se aplicó la fórmula:

$$fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los datos obtenidos fueron representados en gráficas de resultados como incremento o disminución en la expresión de cada gen, en relación con su correspondiente control.

- Análisis con Enrichr

Los análisis de enriquecimiento son un método popular para analizar conjuntos de datos de genes generados de experimentos sobre genoma completo. Los datos obtenidos de diferentes tejidos, células o pacientes muestran listas de genes y proteínas a partir de estudios genómicos, transcriptómicos, epigenómicos y metabolómicos que pueden ser analizados posteriormente en otros estudios al integrar esta información de las diferentes bases de datos donde se depositan. (Kuleshov, et al., 2016; Xie, et al., 2021)

Enrichr es una herramienta que utiliza un motor web que permite la consulta comprensiva y ordenada de cientos o miles de conjuntos de genes que comparten cierta función biológica, localización cromosómica o regulación bajo ciertas condiciones de búsqueda, esto es el análisis mediante enriquecimiento. (Chen, et al., 2013)

Enrichr utiliza algoritmos de búsqueda y luego los compara mediante una prueba de Fisher para evaluar su significancia estadística con respecto a los términos que se colocan para su correlación (Chen, et al., 2013; Kuleshov, et al., 2016; Xie, et al., 2021)

Se puede usar de manera libre en la web en: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>

Resultados

Con el antecedente de que nuestro grupo de trabajo ha reportado que en poblaciones troncales de LMC existe una alta expresión de las moléculas de superficie *MAMDC2* y *PIEZO2*, mismas que parecen asociarse con el estado activo de la enfermedad (Avilés-Vázquez, et al., 2017). Nuestro primer acercamiento sobre los marcadores de interés fue determinar si las poblaciones totales de cada línea presentaban expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*. Para ello se realizó una evaluación de PCR punto final y como lo muestran los datos de la figura 5, las cinco líneas celulares analizadas presentan una banda que corresponde con la expresión de *MAMDC2*. Sin embargo, dado el distinto origen de cada una de las líneas, parece que hay distintos niveles de expresión, lo que posteriormente se verificó mediante qPCR.

Es importante hacer notar, que si bien *MAMDC2* ha mostrado tener una baja expresión en células de tejidos normales como mama de acuerdo con un análisis de expresión de RNA-seq de GETx (The GTEx Portal on 05/13/20 and dbGaP; accession number phs000424.vN.pN on 05/13/2020), su participación en distintos tipos de tumores aún no ha sido explorada.

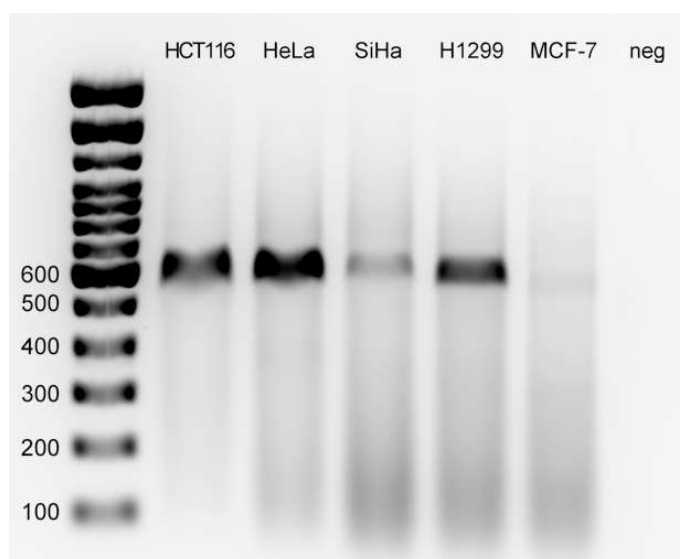


Figura 5. Expresión de *MAMDC2* en líneas celulares de diferentes tumores. A 1×10^6 células provenientes de las líneas HCT116, HeLa, SiHa, H1299 y MCF7 se les determinó la expresión de *MAMDC2* mediante PCR en punto final. Se muestra una figura representativa

de 3 experimentos independientes por duplicado. Los pesos moleculares se muestran en la escalera (carril 1) y el control negativo (carril 7), muestra el resultado utilizando agua como control negativo.

Para el caso de *PIEZO2* cuya participación en procesos tumorales ha sido también poco explorada, nuestros datos indican que su expresión es elevada en cuatro de las cinco líneas celulares analizadas (Figura 5). No obstante, su expresión parece muy reducida o nula en la línea de carcinoma colorrectal HCT116.

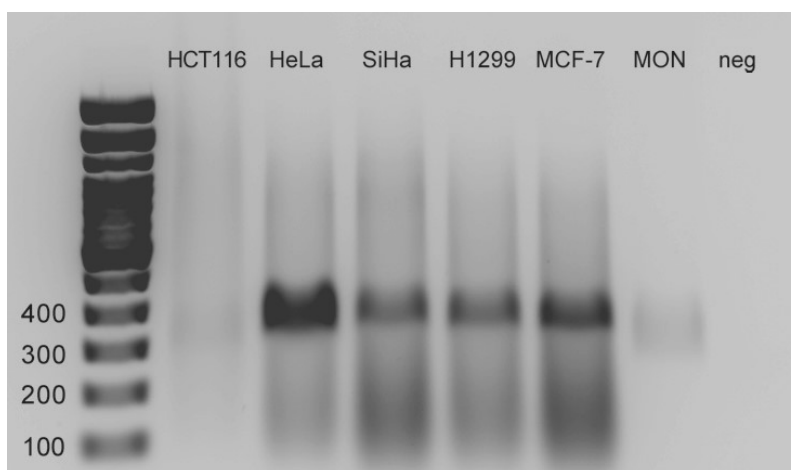


Figura 6. Expresión de *PIEZO2* en líneas celulares de diferentes tumores. A 1×10^6 células provenientes de las líneas HCT116, HeLa, SiHa, H1299 y MCF7 se les determinó la expresión de *PIEZO2* mediante PCR en punto final. La figura muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes por duplicado. Los pesos moleculares utilizados se muestran en la escalera (carril 1) y los carriles 7 y 8 indican expresión en células mononucleares normales y en el control negativo en donde se utilizó agua como templado.

Considerando que los tumores representan poblaciones altamente heterogéneas incluso en modelos de líneas celulares establecidas y con el objetivo de determinar si tal y cómo se observó en LMC (Avilés-Vázquez, et al., 2017), la alta expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* puede estar asociada a células con inmunofenotipo troncal, se procedió a revisar en la literatura si en las líneas celulares utilizadas en este trabajo se ha reportado la existencia de poblaciones con función o inmunofenotipo troncal.

Se procedió a realizar la selección de poblaciones con inmunofenotipos troncales en cada línea para posteriormente analizar la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*.

Como lo muestran los datos de la figura 6, al analizar la línea HCT116 (proveniente de un carcinoma colorrectal humano), se realizó el aislamiento de las células con inmunofenotipo troncal con base en los marcadores de la *tabla 3* de métodos, para esta línea usamos CD24, CD44, CD133 y ALDH, encontramos que después de una primera selección utilizando CD44 y CD133, prácticamente toda la población es doble positiva (5A). Además, dentro de ella, una fracción de aproximadamente 37% presentó una alta expresión de CD44, por lo que se denominó CD133⁺/CD44^{Hi}.

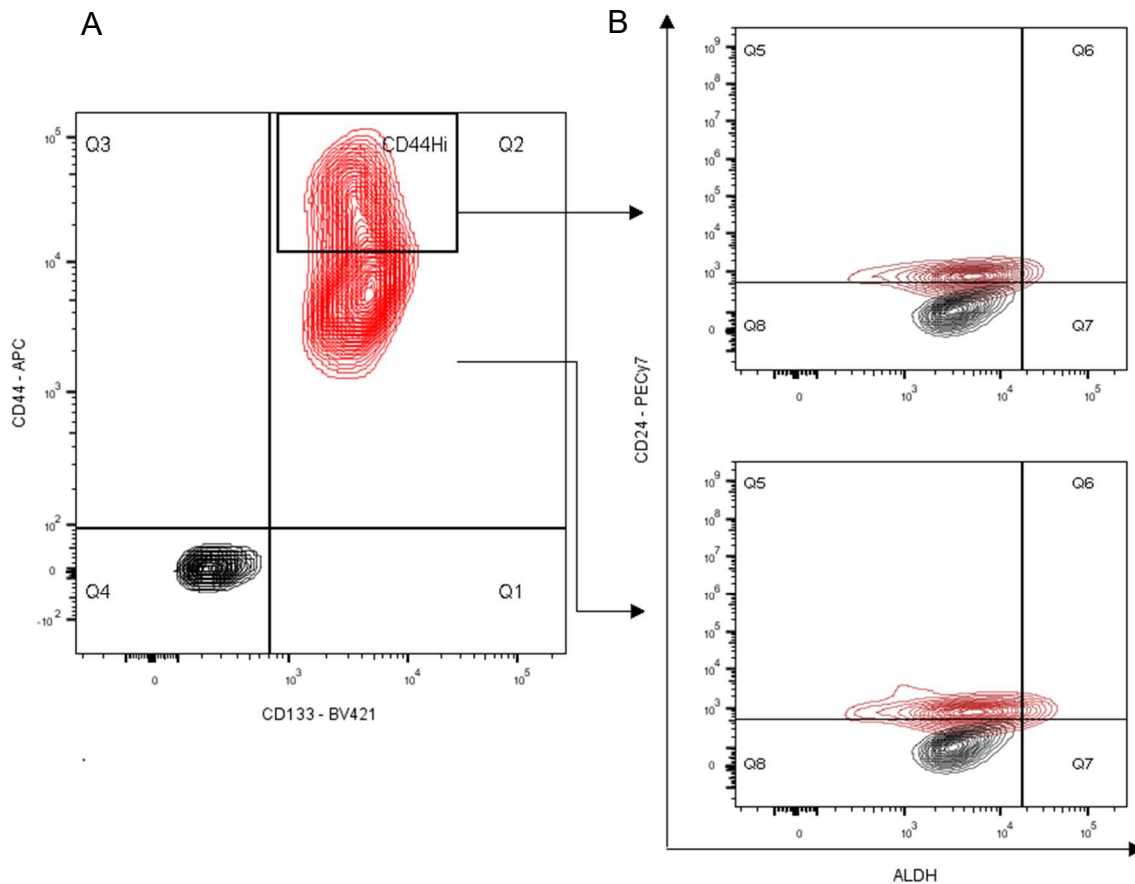


Figura 7. Selección de poblaciones con inmunofenotipo troncal en la línea celular HCT116. A. Se realizó la selección con base en la expresión de CD24, CD44 CD133 y ALDH, se encontró una población CD44^{Hi}. B. Expresión de CD24 y ALDH de las poblaciones doble positivas y CD44^{Hi}. Fluorescencia basal, negro, población con tinción de anticuerpos, rojo. Evaluación representativa de 3 experimentos independientes por triplicado.

Una vez que determinamos que toda la línea celular era CD44⁺/CD133⁺, decidimos hacer una selección con base en la expresión de CD24 y ALDH con la intención de buscar una población menor que pudiera representar a las células troncales.

Como se muestra en la figura 7B, del total de la población doble positiva para CD44 y CD133, aproximadamente el 6.5% corresponde a una población positiva para los cuatro marcadores, mientras que dentro de la fracción CD44^{Hi}, la población positiva también para CD24 y ALDH representa el 1.6% de la línea celular total.

Una vez que se determinó que en la línea celular HCT116 existe una población que podría representar a una población troncal basada en su inmunofenotipo CD24⁺/CD44^{Hi}/CD133⁺/ALDH⁺, se procedió a realizar una purificación mediante FACS para analizar mediante PCR cuantitativo (qPCR) la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*. Los resultados de la figura 8 indican que en la población CD24⁺/CD44^{Hi}/CD133⁺/ALDH⁺ (denominadas “troncales”) la expresión de *MAMDC2* se expresa 1.5 veces más en relación con la población no troncal.

Por otra parte, y en relación con *PIEZO2*, los datos indican que tal y como se mostró en la figura 5 a través de PCR punto final, la expresión es nula en ambas poblaciones celulares, por lo que sería importante determinar si este hallazgo es único para esta línea celular o es algo constante en otras células provenientes del mismo tipo tumoral, lo que haría necesario determinar el papel del *PIEZO2* en la tumorigénesis del colón.

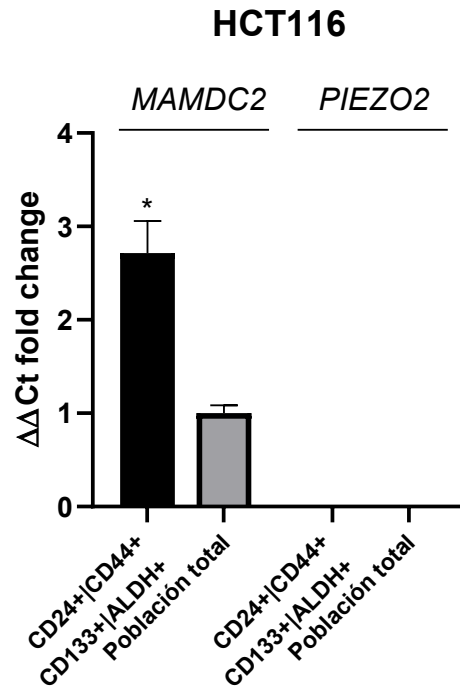


Figura 8. Expresión de MAMDC2 y PIEZO2 en poblaciones con inmunofenotipo troncal y total de la línea celular HCT116 evaluada mediante qPCR. La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH y el incremento en veces se comparó contra la expresión de la línea celular total. * $p < 0.05$ t de student no pareada.

De la misma manera, con base en la tabla 3 de métodos y siguiendo con la evaluación en las demás líneas celulares, encontramos que H1299 (derivada de sitio metastásico en nodo linfático de carcinoma de pulmón de células no pequeñas), expresa casi en su totalidad (97%) los antígenos CD24 y CD44 como se observa en la figura 9. Además, también notamos que una fracción de aproximadamente el 6%, tiene un alto nivel de expresión de CD24, es decir son CD44⁺/CD24^{Hi} (9A).

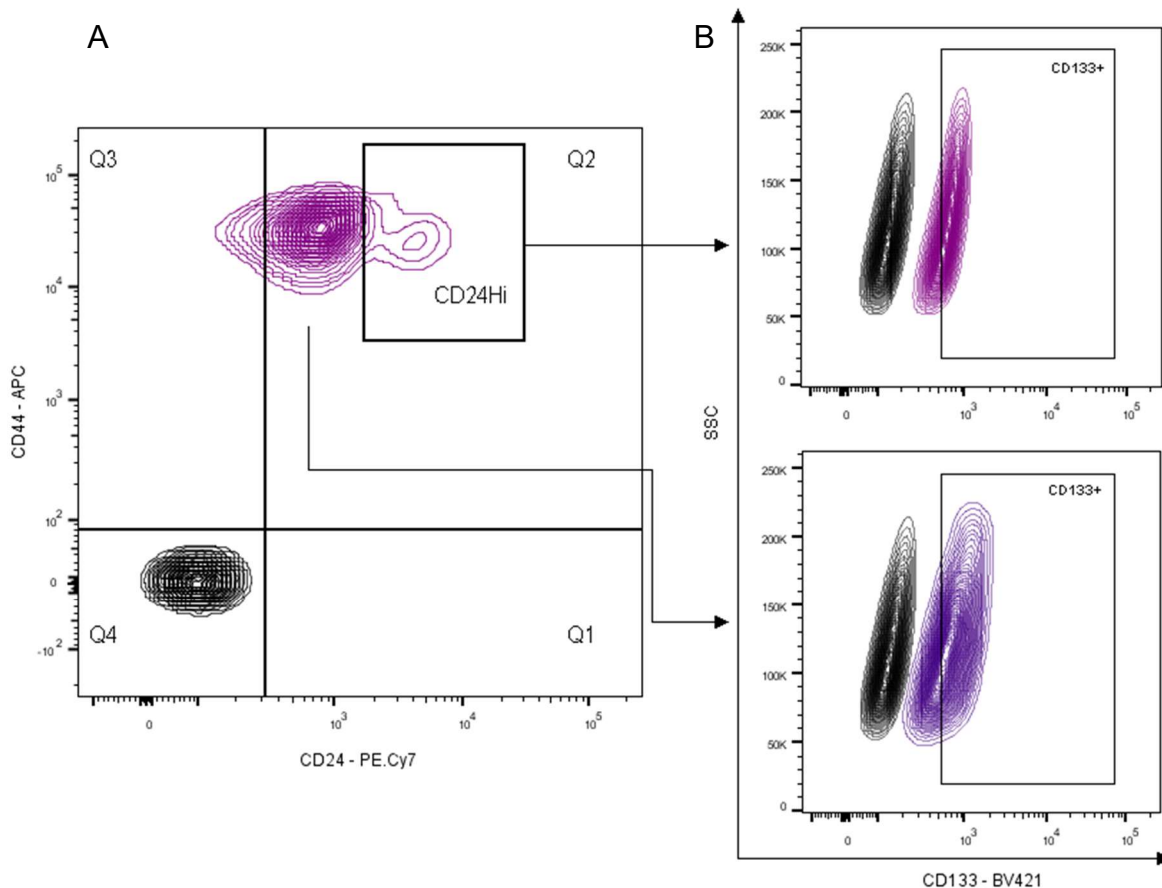


Figura 9. Selección de poblaciones con inmunofenotipo troncal en la línea celular H1299. A. Se realizó la selección con base en la expresión de CD24 y CD44, se encontró una población CD24^{Hi}. B. Expresión de CD133 de las poblaciones doble positivas y CD24^{Hi}. Evaluación representativa de tres experimentos independientes por triplicado en donde el negro indica la fluorescencia basal y el lila la población de interés.

Una vez seleccionada la población CD24⁺/CD44⁺, se procedió a analizar la presencia de CD133, encontrando que se expresa en un porcentaje superior al 80% tanto para la fracción CD24⁺ como para la fracción CD24^{Hi} (figura 9) lo que representa un porcentaje de células con fenotipo troncal de aproximadamente 3.9% del total de la línea celular, si se considera la positividad a los tres marcadores de forma simultánea.

Para el caso de ALDH no se encontraron diferencias entre las células utilizadas como blanco y las teñidas en el ensayo de ALDEFUOR, por lo que este marcador no fue tomado en cuenta en nuestro modelo

Una vez establecido el inmunofenotipo CD24^{Hi}/CD44⁺/CD133⁺ se aisló mediante FACS a la población troncal y se realizó la evaluación de la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2*.

En esta línea celular se puede apreciar que la expresión de ambas moléculas en la fracción con inmunofenotipo troncal es mayor en comparación con la población no troncal. En la qPCR la expresión de ambas moléculas es 6×10^5 veces mayor en las células troncales en comparación con la población no troncal. Dado que nuestra selección incluía CD133, considerado como marcador de troncalidad del tejido pulmonar y nuestra población total contenía más del 85% de células positivas, esto podría significar que la mayoría de la expresión que se observa por PCR punto final es proveniente de la población en cultivo, donde un alto porcentaje incluía células con un inmunofenotipo asociado a troncalidad.

Esta observación genera la necesidad de conocer si ambas moléculas están involucradas en la fisiología de la función pulmonar o si su presencia puede ser indicativo de procesos tumorales, por lo que el análisis en muestras primarias (tanto normales como tumorales en diferentes estadios) sería de suma relevancia.

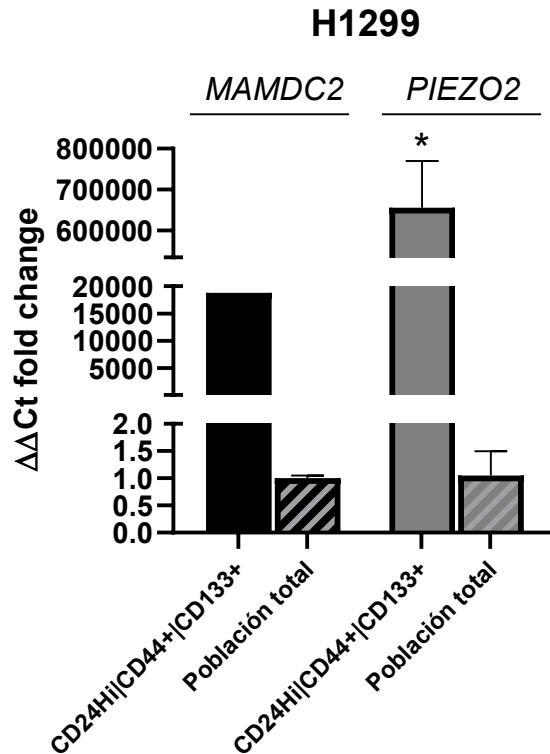


Figura 10. Expresión de MAMDC2y PIEZO2 en poblaciones con inmunofenotipo troncal y total de la línea celular H1299 evaluada mediante qPCR. La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH y el incremento en veces se comparó contra la expresión de la línea celular total. * $p < 0.05$ t de student no pareada.

Posteriormente, se analizó la línea MCF-7 (derivada de un adenocarcinoma mamario metastásico). Para el cual, se consideró el inmunofenotipo CD24⁻/CD44⁺ planteado en el estudio de (Al-Hajj, et al., 2003) que fue el primero en describir células troncales tumorales provenientes este tejido.

Como lo muestran los datos de la figura 11, se encontró que aproximadamente el 4% de la población total es C24⁻/CD44⁺.

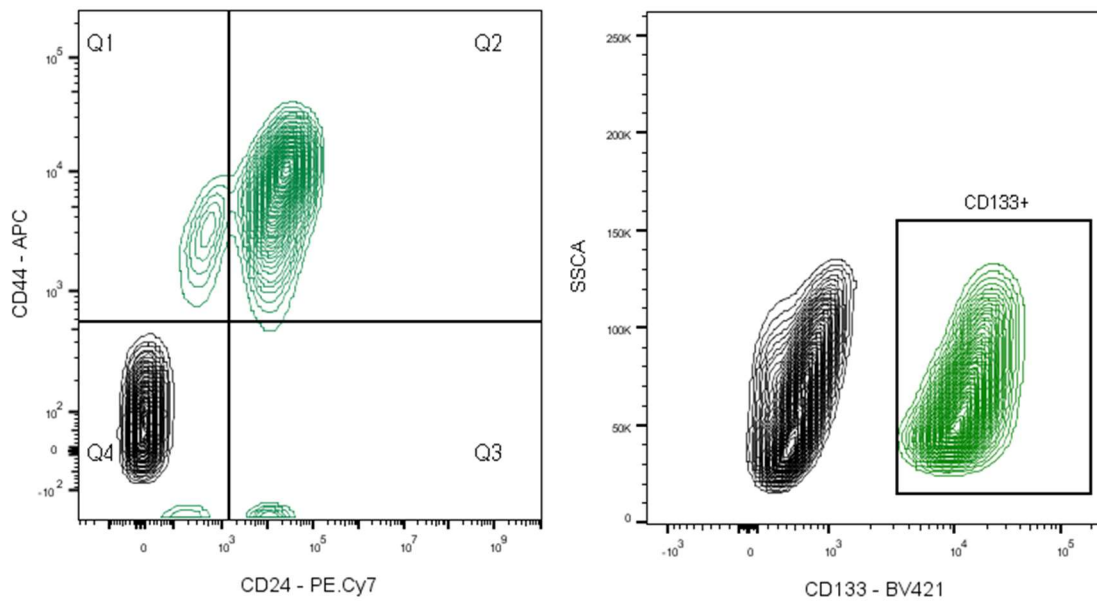


Figura 11. Selección de poblaciones con inmunofenotipo troncal en la línea celular MCF-7. Se realizó la selección con base en el fenotipo CD24⁻/CD44⁺. Expresión de CD133 sobre las células CD24⁻/CD44⁺. Evaluación representativa de tres experimentos independientes por triplicado en donde la fluorescencia basal se marca en negro y las poblaciones de interés en verde.

Para CD133 se encontró que prácticamente el 100% de las células con el fenotipo mencionado era positiva para el marcador, lo que corresponde a lo reportado en la literatura (Nadal, et al., 2013) (*figura 11*). De este modo el inmunofenotipo con el que se hizo la selección final se mantuvo como el originalmente descrito CD24⁻/CD44⁺ (Al-Hajj, et al., 2003).

Una vez establecido este inmunofenotipo se prosiguió con el análisis de expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* en ambas fracciones (tanto troncal como no troncal), encontrando que, aunque existe una tendencia a incrementar la expresión de *MAMDC2* en la población troncal, el cambio no es significativo en relación con lo expresado en células con la población total (*figura 12*).

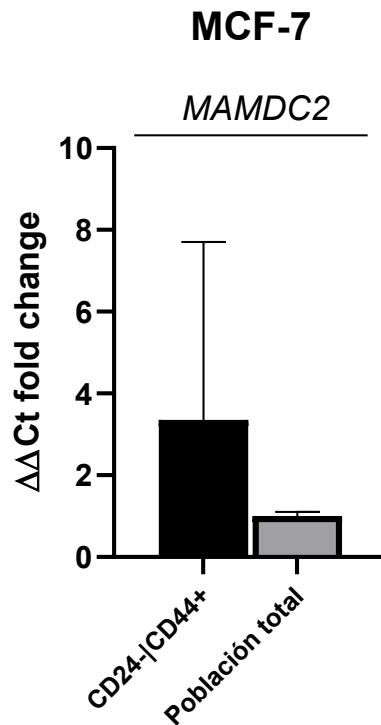


Figura 12. Expresión de MAMDC2 en poblaciones con inmunofenotipo troncal y no troncal de MCF-7 evaluada mediante qPCR. La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH y el incremento en veces se comparó contra la expresión de la línea celular total. * $p < 0.05$ t de student no pareada, tres experimentos independientes por duplicado.

En el caso de la evaluación de *PIEZO2*, no se muestra el resultado debido a que en la fracción troncal hubo una completa ausencia de expresión mientras que en la fracción no troncal sí hubo un valor de expresión por lo que el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ no se pudo aplicar.

Continuando con nuestro análisis, se procedió a determinar el inmunofenotipo asociado a troncalidad en las líneas de cáncer de cérvix. La primera en evaluarse fue la línea celular HeLa, que proviene de un adenocarcinoma cervical positivo para el Papiloma Virus Humano (HPV) tipo 18. En ella se encontró, que el inmunofenotipo troncal $\text{ALDH}^+/\text{CD133}^+$ corresponde a más del 18% de la población celular (Figura 13).

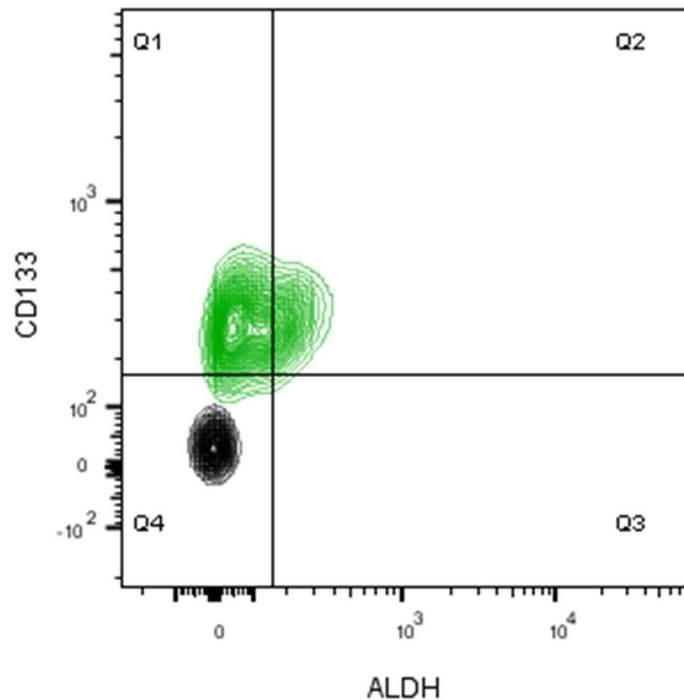


Figura 13. Evaluación de la población con fenotipo troncal con base en la expresión de ALDH y CD133 en HeLa. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes por triplicado. En la imagen se observa la autofluorescencia en color negro y la tinción con anticuerpos en verde.

En cuanto a los marcadores CD24 y CD44, nuestras evaluaciones mostraron el 100% de positividad por lo que no fueron considerados como marcadores de troncalidad, aunque se ha reportado la presencia del marcador CD44⁺ en células de carcinoma de cérvix en muestras primarias con capacidad tumorigénica en ratones desnudos, así como de formación de esferas (Feng, et al., 2009).

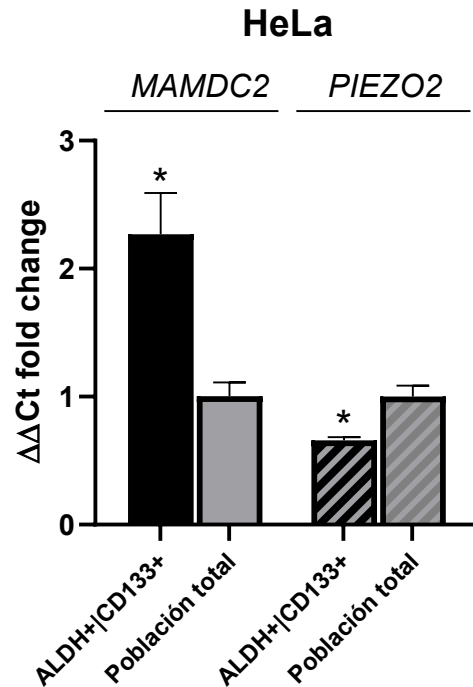


Figura 14. Expresión de MAMDC2 y PIEZO2 en poblaciones con inmunofenotipo troncal y total de la línea celular HeLa evaluada mediante qPCR. La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH y el incremento en veces se comparó contra la expresión de la línea celular total. * $p < 0.05$ t de student no pareada, tres experimentos independientes por duplicado.

Al evaluar la expresión de nuestras moléculas de estudio, se encontró la expresión de MAMDC2 en la población troncal es 2 veces mayor que la población no troncal, resultado esperado debido a lo observado mediante PCR punto final (figura 5).

En el caso de PIEZO2 podemos apreciar un resultado contrastante, ya que en este caso la expresión de la molécula es menor significativamente en la población no troncal, por lo que sería importante determinar qué papel podría desempeñar en las células del cérvix

Para finalizar el análisis, se determinó el inmunofenotipo asociado a troncalidad de la línea SiHa (de origen epitelial derivada de un carcinoma de células escamosas de cérvix, positivo para HPV tipo 16). En este caso, al igual que para HeLa, la

población con fenotipo asociado a troncalidad se encuentra en las células ALDH⁺/CD133⁺.

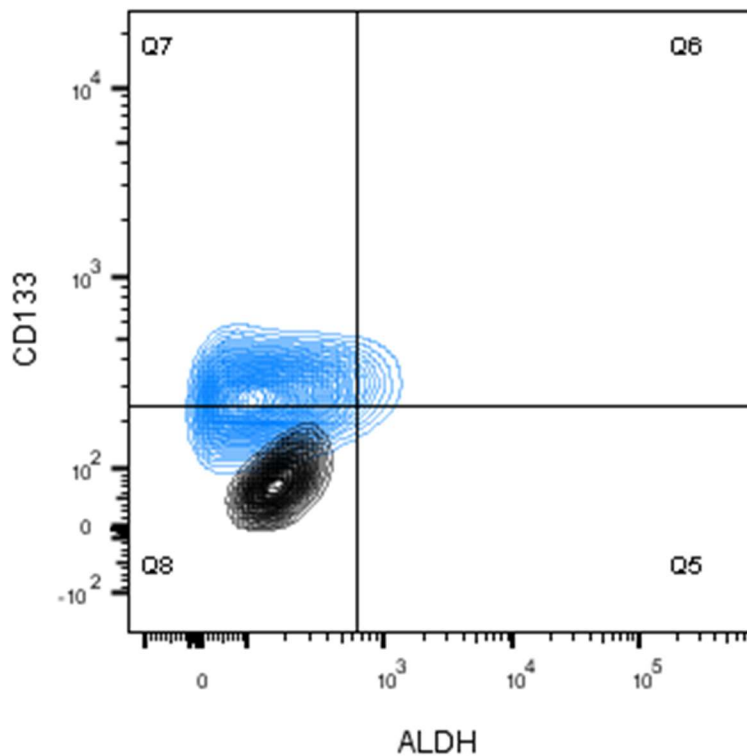


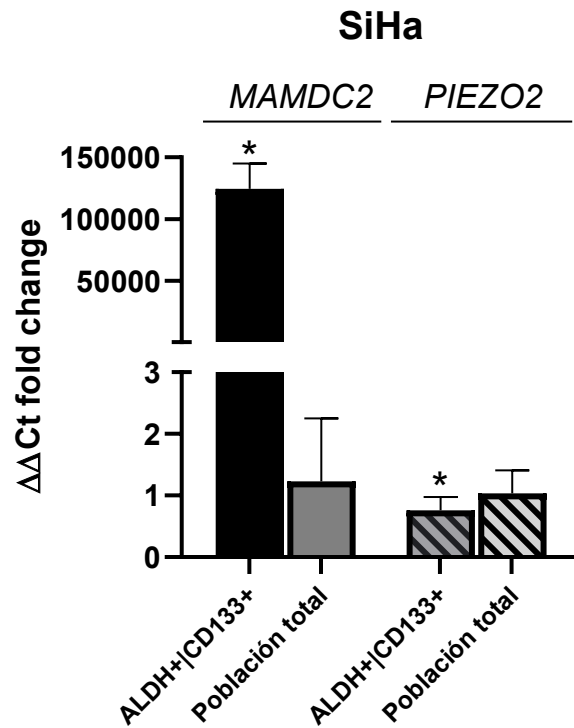
Figura 15. Evaluación de la población con fenotipo troncal con base en la expresión de ALDH y CD133 presentes en la población tronca para la línea SiHa. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes por triplicado en donde se observa la autofluorescencia negro y la tinción con anticuerpos en azul.

En este análisis encontró que aproximadamente 5% de las células presentan ambos marcadores (figura 15).

En este caso, al igual que en la línea Hela, el total de la población resultó ser positiva para CD24 y CD44 por lo que solo la expresión diferencial de ALDH y CD133 fue considerada para el asilamiento mediante FACS de la población troncal.

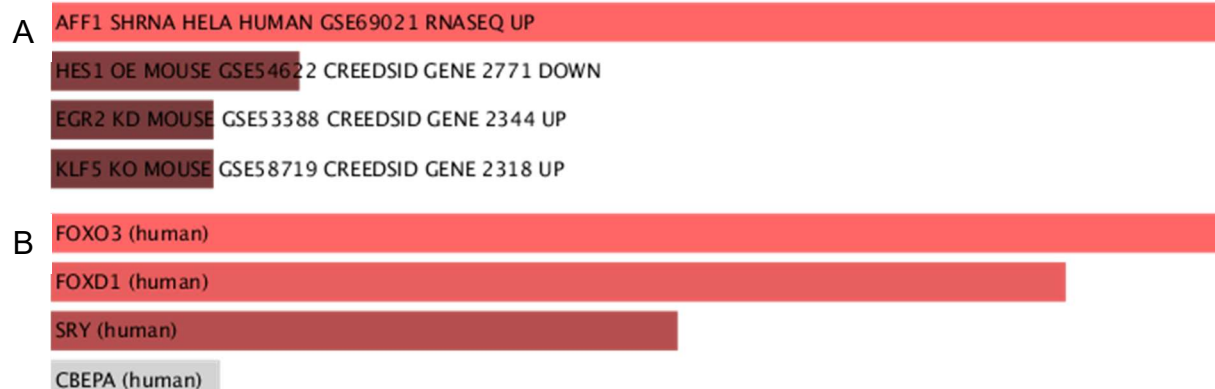
Como se observa en la figura 16, la expresión de *MAMDC2* se encuentra altamente expresada en la población con inmunofenotipo troncal de las células SiHa, siendo más de 1×10^5 veces mayor que en fracción no troncal. No obstante, en el caso de

PIEZO2, también se detecta una tendencia de menor expresión en la fracción troncal con respecto a la no troncal de manera significativa (*figura 16*).



*Figura 16. Expresión de MAMDC2 y PIEZO2 en poblaciones con inmunofenotipo troncal y total de la línea celular SiHa evaluada mediante qPCR. La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH y el incremento en veces se comparó contra la expresión de la línea celular total. * $p < 0.05$ t de Student no pareada, tres experimentos independientes por duplicado.*

Con el objetivo de hacer un análisis de la posible función de *MAMDC2* y *PIEZO2* en células troncales y en cáncer, finalmente se realizó una búsqueda *in silico* utilizando la herramienta Enrichr (Chen, et al., 2013; Kuleshov, et al., 2016; Xie, et al., 2021) de posibles factores de transcripción relacionados con su expresión y se encontró su relación con factores como FoxO3 y Aff4 (*figura 15*).



*Figura 15. Factores de transcripción asociados a la expresión de PIEZO2 y MAMDC2 en Enrichr. A. Factores de transcripción asociados a expresión aberrante en ensayos experimentales. B. Factores de transcripción predichos basados en compatibilidad de motivos de unión en las bases de datos TRNASFAC y JASPAR. Las barras superiores con el color ■ presentan p-value $*p < 0.01$, color ■ $*p < 0.05$, y ■ $*p < 0.05$ en estudios en ratón.*

En el análisis de enriquecimiento de factores de transcripción asociados a la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* de experimentos de estudios de genoma completo en bases de datos (15A) se encontró que en HeLa un estudio de silenciamiento de AFF1 con shRNA aumentó la expresión de ambas moléculas.

Por otro lado, las bases de datos TRNASFAC y JASPAR utilizan la homología de secuencias para predicción de factores de transcripción que se unen al sitio promotor de ambos genes tanto *MAMDC2* y *PIEZO2*, en este caso se encontró que algunos de los principales factores de transcripción en humanos asociados son FOXO3 y FOXD1.

Discusión

El estudio de los tumores humanos representa una de las áreas de mayor interés en la ciencia y en la medicina humana ya que si bien existen importantes avances en los métodos de detección y tratamiento para algunos de ellos, aún existen tumores que se encuentran con alta prevalencia y mortalidad, tal y como sucede para los cánceres de mama, cérvix, colón y pulmón dentro de la población mexicana.

Un aspecto que ha cobrado creciente interés en el estudio del cáncer es la detección de las células troncales, las cuales se han descrito como poblaciones celulares numéricamente reducidas pero responsables del mantenimiento de la enfermedad.

En ese sentido y con la intención de buscar marcadores asociados a los procesos tumorales, nuestro grupo de trabajo describió recientemente la presencia de algunas moléculas sobre-expresadas en células troncales de LMC por lo que surgió el interés de evaluarlas en tumores sólidos de alta prevalencia en nuestra población.

Como ya se mencionó antes, el estándar de oro hoy en día para la determinación de células troncales es el xenotrasplante ya que evalúa la capacidad de autorrenovación y diferenciación (Dick, 2009), sin embargo, existen otros modelos para determinación de estas mismas funciones *in vitro* que han servido en gran medida para el estudio de células troncales de forma más accesible.

En el caso de nuestro trabajo, para nuestra selección de poblaciones celulares nos hemos basado en los reportes de otros autores que han definido inmunofenotipos asociados a troncalidad en evaluados en diferentes modelos en donde han mostrado tener esta capacidad de célula troncal.

Para la línea celular HCT116 encontramos primero una población CD44^{Hi}/CD133⁺ lo que concuerda con lo reportado por (Sahlberg, et al., 2014) quienes también encontraron una población CD44^{Hi} en la misma línea celular, con una proporción de células con fenotipo CD44⁺/CD133⁺ mayor al 60%. Así mismo, encontraron que, de esta fracción doble positiva, el 20% corresponde a células que presentan el marcador CD24.

Al incluir en nuestra selección CD24 y ALDH encontramos una población con el inmunofenotipo CD24⁺/CD44^{Hi}/CD133⁺/ALDH⁺ correspondiente al 1.5% del total, cantidad que, aunque un poco menor, concuerda con lo reportado por Huang et al (2009), quienes mencionan que el 3.5% de células de cáncer colorrectal provenientes de muestras primarias enriquecidas con base en la expresión de ALDH son capaces de iniciar tumores en modelos de xenotrasplante; además, dicha

proporción iniciadora de los tumores se incrementa al 19.5 y 24.8% conforme la población se enriquece utilizando CD44 o CD133 respectivamente (Huang, et al., 2009).

Para el caso de la línea H1299 se ha reportado que más del 81% de la población es positiva para CD44 y estas células tienen la capacidad de producir tumores en ratones inmunodeficientes con un injerto de hasta 1×10^4 células (Leung, et al., 2010), nuestra selección hecha con CD24 y CD44 fue del 97% y una fracción doble positiva con CD24^{Hi} del 6%. Aunado a lo anterior, la presencia de CD24 también ha sido reportada en modelos murinos capaces de formar tumores (Ho, et al., 2007; Ebben, et al., 2010).

Al incluir el marcador CD133 a nuestro inmunofenotipo troncal final, encontramos una fracción del 3.9% con respecto a la línea celular total, este hallazgo es interesante, ya que CD133 ha sido reportado como marcador de células troncales de pulmón (Templeton, et al., 2014; Guo, et al., 2015; Leon, et al., 2016), con presencia escasa y porcentajes muy heterogéneos no mayores al 3.5% en algunos casos. Esto contrasta de manera relevante con nuestros resultados, sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo, como la formación de tumoroesferas, la expresión de este marcador aumenta significativamente tanto en muestras primarias (Eramo, et al., 2008) como en células H1299 en más del 83% (Huang, et al., 2013). Es probable que las variaciones numéricas encontradas en este trabajo y lo previamente reportado se deba a diferencias en el estado del cultivo o incluso en el pasaje celular que se analizó.

En lo que respecta a MCF-7 se consideró tomar el inmunofenotipo inicialmente descrito para células troncales de cáncer de mama, nuestra población CD24⁻/CD44⁺ correspondió al 4% de la línea celular total, en similitud con valores reportados en otros estudios para esta misma línea celular, que indican la presencia del 2-4% de células con dicho fenotipo (Sun, et al., 2013; Chen, et al., 2012; Wang, et al., 2014). Aunque es importante tener en cuenta que condiciones de cultivo 3D (que favorece el enriquecimiento de células troncales), esta proporción aumenta significativamente (Chen, et al., 2012).

Cabe mencionar que, aunque está bien documentado el uso de ALDH como marcador adicional al inmunofenotipo CD44⁺/CD24⁻, en muestras de tumores primarios (Ginestier, et al., 2007; Ricardo, et al., 2011) en nuestros cultivos no se encontró proporción significativa de células ALDH⁺.

En el caso de HeLa, como se ve en resultados, nuestro porcentaje celular con el inmunofenotipo asociado a troncalidad ALDH⁺/CD133⁺ es mayor a lo reportado para ALDH por Ortiz-Sánchez et al (2016) quien encontró que las células ALDH⁺ tienen potencial de formación de esferas, además de una alta expresión de marcadores de troncalidad como proteínas Oct4, Nanog y β -catenina además de un mayor potencial tumorigénico (Ortiz-Sánchez , et al., 2016).

Aunado a lo anterior, también se ha reportado que el marcador CD133 se ve aumentado en líneas celulares de cáncer de cérvix incluida HeLa y SiHa posterior a la formación de tumoroesferas (López, et al., 2012; Mendoza-Almanza, et al., 2019). No obstante, en estos estudios no se reporta la cantidad de células positivas para ese marcador.

Finalmente, con SiHa nosotros reportamos 5% de células con inmunofenotipo ALDH⁺/CD133⁺ del total de la población lo que representa un porcentaje similar a lo reportado para ALDH por (Ortiz-Sánchez , et al., 2016) en esta línea celular, quienes encontraron una población del 4.24%, pero es menor al número obtenido cuando las células son cultivadas en forma de esferas (Liu & Zheng, 2013)

En este caso, CD133 también ha sido reportado como marcador asociado a células con capacidad de formación de tumoroesferas *in vitro* para determinación de función troncal (López, et al., 2012; Mendoza-Almanza, et al., 2019).

Al momento de evaluar nuestras moléculas de interés los datos obtenidos en este trabajo muestran que de forma similar a lo obtenido por (Avilés-Vázquez, et al., 2017) para LMC, existe una expresión diferencial de las moléculas *MAMDC2* y

PIEZO2 en las poblaciones con inmunofenotipo troncal tumoral, en relación con la población celular total, lo que de inicio vuelve a mostrar que los tumores son altamente heterogéneos ya que mientras la molécula *MAMDC2* se encuentra sobre-expresada en las cinco líneas analizadas en este estudio, *PIEZO2* puede estar altamente expresado (como se observó en la línea de cáncer de pulmón), estar sub-expresada (observado en cáncer de cérvix), o bien ser indetectable (en el caso de colón).

En las líneas de cáncer de cérvix, el resultado en relación a *MAMDC2* es muy relevante ya que aunque el sitio anatómico del que provienen ambas líneas es el mismo, existe una clara diferencia de expresión entre las poblaciones de ambas, lo que podría estar relacionada con los diferentes tipos de HPV asociados a cada una de estas líneas celulares, que además muestran diferencias en la expresión de las oncoproteínas p53 y RB ya que mientras la línea SiHa las expresa de forma normal, la línea celular Hela carece de la expresión de p53 debido a la expresión de E6 causada por el virus (Haupt, et al., 1997). Este hallazgo abre nuestro interés de evaluar la expresión de esta molécula en otras líneas celulares, así como en muestras primarias para determinar la correlación en su expresión con la presencia o ausencia de diferentes tipos del HPV.

La expresión de *PIEZO2*, ha sido reportada como disminuida en muestras de cáncer de mamá en comparación con su contraparte normal; mientras que su sobre expresión parece asociarse como un factor pronostico favorable (Lou, et al., 2019). Aunado a lo anterior, se ha sugerido que *PIEZO2* es necesario en procesos de metástasis de cáncer mamario en donde parece activar la vía de RhoA a través del flujo de Ca^{2+} y la activación de las cinasas Fyn. Dicha participación en metástasis y migración se reduce en células carentes de *PIEZO2* (Pardo-Pastor, et al., 2018). De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, *PIEZO2* se encuentra sub-expresado en la línea celular MCF7 lo que podría significar que al igual que las líneas de mayor malignidad, le confiere una ventaja en su crecimiento.

Un dato relevante de este estudio fue encontrar que *PIEZO2* se encuentra muy sobre expresado en la línea celular carcinoma de pulmón H1299, hallazgo que

contrasta con los datos mostrados por Huang y colaboradores quienes encuentran que muestras tumorales primarias, así como las líneas de carcinoma epitelial pulmonar A549 y CCL185, tienen una reducida expresión de *PIEZO2* en comparación con los tejidos aledaños normales, situación que proponen se asocia con la capacidad de migración ya que aparentemente una alta expresión correlaciona con una mayor sobrevida (Huang, et al., 2019) Cabe mencionar que la diferencia con nuestra evaluación puede deberse a que en éste reporte se analiza el tejido total, mientras que nuestro estudio se enfoca a la población con fenotipo troncal residente en la línea celular. Aunado a lo anterior, sería muy relevante explorar la expresión de dicha molécula en poblaciones troncales provenientes de tumores primarios.

A la fecha aún no se ha explorado la participación de *PIEZO2* en tumores colorrectales y cáncer de cérvix, pero de acuerdo con lo antes descrito, el que en éste estudio su expresión se encuentre nula o reducida podría tener correlación con la capacidad de angiogénesis, migración y/o metástasis, funciones que parecen ser las principales para ésta molécula y de las cuales se encuentra información en cáncer de vejiga y carcinoma escamoso de laringe (Cheng, et al., 2017; Etem, et al., 2018).

Aunado a lo anterior y utilizando un modelo celular de glioma, se ha demostrado que este mecanotransductor tiene un efecto supresor del crecimiento tumoral, evento que parece asociarse con la vía de señalización Ca^{2+} /Wnt11/ β -catenina en donde también regula procesos de angiogénesis tumoral y metástasis ya que facilita la permeabilidad tumoral a través del endotelio, efecto que se revierte cuando las células tumorales son silenciadas para la expresión de *PIEZO2* (Yang, 2016). Esta participación de la vía de calcio en células endoteliales también ha sido relacionada con eventos de resistencia (adquirida o intrínseca) para terapias antitumorales (Moccia, 2018).

En cuanto a la molécula *MAMDC2*, fue muy interesante encontrar que de las cinco líneas evaluadas de cuatro tejidos distintos, en todas existe una expresión incrementada (una o varios cientos de veces) en células asociadas con fenotipos

troncales tumorales, hallazgo que es contrastante con los resultados reportados en la literatura, en donde se indican una reducción en la expresión de *MAMDC2*.

Específicamente en el caso de los tumores analizados en este estudio, Lim y colaboradores reportaron que *MAMDC2* se encuentra disminuido en cáncer de pulmón de células no pequeñas, (Lim, et al., 2017), evento que correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, estudios *in silico* han mostrado que la expresión génica de *MAMDC2* se encuentra sub-expresado en pacientes con cáncer de colon (Yang, et al., 2019), donde además mediante estudios bioinformáticos de comparación de expresión en las bases de datos del *GEO*, se ha sugerido que forma parte de un grupo de genes cuya expresión reducida (en relación a tejidos sanos), se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (Yang, et al., 2019).

El mismo factor pronostico desfavorable ha sido también propuesto para cáncer mamario, indicando que en tumores donde *MAMDC2* se encuentra sub-expresado, también existe una menor supervivencia libre de enfermedad, así como peor pronóstico (Meng, et al., 2016). Reportes similares han sido mostrados para carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Darda, et al., 2015) y carcinoma ductal infiltrante (Meng, et al., 2016).

En el caso de tumores cervicales, así como colorrectales, la participación de *MAMDC2* no ha sido descrita. Sin embargo vale la pena reiterar que si bien los datos reportados muestran una reducción en la expresión de *MAMDC2*, todas estas evaluaciones se han realizado utilizando la totalidad de los tumores y en ninguna de ellas se ha asociado su presencia o ausencia con poblaciones con inmunofenotipo troncal por lo que sería de enorme trascendencia el evaluar el papel exacto de estas dos moléculas dentro en la biología de las poblaciones responsables de mantener la enfermedad en donde muy probablemente pudieran proponerse como nuevos marcadores de superficie asociados a células troncales, o bien evaluar su expresión en muestras biológicas que han sido sometidas a algún tipo de tratamiento, lo que también podría sugerirlas como marcadores pronósticos o de seguimiento, tal y

como está siendo encontrado por nuestro grupo de trabajo para células troncales de LMC.

Finalmente, para el análisis de enriquecimiento de factores de transcripción, se observó que en un estudio de expresión post silenciamiento con shRNA en la línea celular HeLa, el silenciamiento de AFF1 fue seguido por una regulación a la alta de ambas moléculas: en este artículo de (Huasong, et al., 2015) estudian la capacidad del VIH de emplear supercomplejos de elongación para facilitar la replicación viral. No hay alguna relación con nuestras moléculas de interés, sin embargo, se explica que el potencial oncogénico de AFF1 y AFF4 asociado a MLL es conferido gracias a asociaciones con complejos de elongación de la Polimerasa II de RNA activos dimerizados por los dominios C-terminales de AFF1/4 y que al silenciar ambos factores de transcripción se expresan de manera diferencial genes relacionados con cáncer incluyendo algunos relacionados con adhesión celular, migración y muerte celular (Huasong, et al., 2015).

Por otro lado, el factor de transcripción FoxO3 se ha reportado que está involucrado en traslocaciones cromosómicas que resultan en el desarrollo de patologías como rhabdomyosarcoma alveolar y leucemia aguda (Hillion, et al., 1997; Hornsveld, et al., 2018). También tiene un importante papel en el funcionamiento y mantenimiento de SC del sistema hematopoyético manteniendo la homeostasis del estrés oxidativo regulando vías como mTOR, PTEN, la vía de las pentosas fosfato y la regulación de la autofagia (Yalcin, et al., 2008; Rimmelé, et al., 2015) y también en SC neurales (Yeo, et al., 2013).

Así mismo, más recientemente se ha reportado que su participación es clave para el mantenimiento de las propiedades troncales en cáncer de páncreas mediante la expresión de CD44, un importante marcador de troncalidad, a través de la activación de vías como la cinasa hepática B1 (LKB1) /proteína cinasa activada por AMP (AMPK) /receptor de peroxisoma-proliferador-activado- γ coactivador 1 β (PGC-1 β) /piruvato deshidrogenasa 1 (PDHA1) (Kumazoe, et al., 2017).

Por su parte el gen *Aff1* (también *AF4*) es una proteína cuyo papel en el desarrollo de leucemia linfoblástica infantil está ampliamente descrito mediante su fusión con el gen de linaje mixto en leucemia (*MLL/KMT2A*) (Marschalek, 2011) y también se ha descrito su papel en el mantenimiento y diferenciación de células estromales mesenquimales (*MSC*) (Zhou, et al., 2017), sin embargo, de manera más interesante se ha reportado que se encuentra implicado en la expresión de *CD133*, marcador utilizado también para la identificación de *CSC*, ya que las células que expresan este marcador tienen una elevada radio resistencia y son un indicativo de pobre pronóstico (Jang, et al., 2017; Mark, et al., 2012).

La presencia del gel de fusión *AF4-MLL* tiene una importante implicación en el desarrollo de leucemia y se ha demostrado que un conjunto de células que contienen ésta anomalía cromosómica son dependientes de la presencia de *CD133* para su supervivencia, así mismo, éstas células son las responsables de la iniciación y recaída de los pacientes cuyo fenotipo más primitivo también incluye el marcador *CD133* (Marks, et al., 2013; Cox, et al., 2009).

De manera importante, esta relación de la presencia de *AF4-MLL* con la expresión de *CD133* también ha sido reportada en otros tipos de cáncer como colon y linfoma (Mark, et al., 2012).

Estos resultados en conjunto resultan importantes ya que representan un primer acercamiento al estudio de *MAMDC2* y *PIEZO2* como posibles marcadores de células con fenotipo troncal en los tumores de mayor prevalencia en la población mexicana y aunque si bien es cierto los datos de *PIEZO2* son muy heterogéneos, los resultados encontrados para *MAMDC2*, lo pueden situar como un posible marcador de células troncales tumorales humanas (*tabla 8*).

Tabla 8. Líneas celulares analizadas, fenotipo troncal asociado y comparación en la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* de la población troncal con respecto a la fracción no troncal en cada una.

Línea celular	Inmunofenotipo asociado a troncalidad	Expresión de <i>MAMDC2</i>	Expresión de <i>PIEZO2</i>
HCT116 Carcinoma colorrectal	CD24 ⁺ /CD44 ^{Hi} /CD133 ⁺ /ALDH ⁺ (6.5%)	Incrementado 1.5 veces	No expresado
H1299 Carcinoma de pulmón	CD24 ⁺ /CD44 ⁺ /CD133 ⁺ (3.9%)	Incrementado 6x10 ⁵ veces	Incrementado 6x10 ⁵ veces
MCF7 Adenocarcinoma mamario	CD24 ⁺ /CD44 ⁺ /CD133 ⁺ /ALDH ⁺ (2-4%)	Incrementado 3 veces	No expresado
HeLa (adenocarcinoma de cérvix, HPV-18)	CD133 ⁺ /ALDH ⁺ (18%)	Incrementado 2.3 veces	Disminuido 0.3 veces
SiHa (carcinoma de células escamosas, HPV-16)	CD133 ⁺ /ALDH ⁺ (5%)	Incrementado 1x10 ⁵ veces	Disminuido 0.2 veces

Por una parte *MAMDC2*, cuya presencia y función ha sido poco explorada en cáncer, mostró tener una importante sobreexpresión en la mayoría de las células con fenotipo troncal, mientras que *PIEZO2* mostró ser un poco más heterogéneo ya que no todas las líneas celulares mostraron una sobreexpresión en la población troncal, sin embargo, esta molécula ya ha empezado a tener atención y a ser estudiada en cáncer a pesar de que no se han reportado estudios específicamente hechos en células con fenotipo troncal, estos estudios revelan que dependiendo del tipo de cáncer puede tener funciones diferentes, no obstante también se remarca la necesidad de estudiar más a fondo su función y el papel que juega en la biología de las células troncales.

Conclusiones

MAMDC2 se encuentra sobre-expresada de manera significativa en la fracción troncal de la mayoría de las líneas celulares estudiadas.

PIEZO2 mostró una diferencia de expresión heterogénea entre las subpoblaciones con inmunofenotipos troncales y no troncales de las diferentes líneas celulares, sin embargo, esta diferencia de expresión también es característica del tejido y tipo de cáncer.

Un análisis *in silico* de enriquecimiento de factores de transcripción sugiere que su expresión es regulada por FoxO3, Aff1/AF4 y KLF4, factores de transcripción asociados a cáncer y CSC en particular.

Perspectivas

Realizar ensayos de tumoresferas para la evaluación del enriquecimiento del inmunofenotipo en las líneas celulares.

Evaluar la expresión de *MAMDC2* y *PIEZO2* en tejidos provenientes de muestras primarias de los diferentes tipos de cáncer y compararlos con tejidos normales.

Hacer ensayos de silenciamiento para evaluar las posibles vías de señalización implicadas con estas moléculas y su papel en la función de las células aplicando otras metodologías como CHIP para evaluar estados de expresión de otros genes.

Estudiar la presencia de las moléculas en membrana mediante citometría de flujo y de esta manera evaluar su posible uso como marcadores rápidos de células troncales o evaluar su posible uso como biomarcadores de progresión y diagnóstico.

Referencias

Akbari-Birgani, S. et al., 2016. Cancer stem cells, cancer-initiating cells and methods for their detection. *Drug Discov Today*, 21(5), pp. 836-842.

Aldaco-Sarvide, F. et al., 2018. Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gac Mex Oncol*, Volume 17, pp. 28-34.

Al-Hajj, M. et al., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 100(7), pp. 3983-3988.

Avilés-Vázquez, S. et al., 2017. Global gene expression profiles of hematopoietic stem and progenitor cells from patient with chronic myeloid leukemia: the effect of in vitro culture with or without imatinib. *Cancer Med*, 6(12), pp. 2942-2956.

Bagriantsev, S. N., Gracheva, E. O. & Gallagher, P. G., 2014. Piezo Proteins: Regulators of Mechanosensation and Other Cellular Processes. *J Biol Chem*, 289(46), pp. 31673-31681.

Bakhshinyan, D. et al., 2018. Introduction to cancer stem cells: past, present, and future. In: J. M. Walker, ed. *Methods in Molecular Biology. Cancer Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 12-27.

Barkal, A. A. et al., 2019. CD24 signaling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*, Volume 572, pp. 392-396.

Bhatia, M. et al., 1997. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, Volume 94, pp. 5320-5325.

Blanpain, C., 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol*, 15(2), pp. 126-134.

Boffetta, P., 2014. Cancer Epidemiology. In: W. Ahrens & I. Pigeot, eds. *Handbook of Epidemiology*. Second ed. New York: Springer Science+Business Media, pp. 2159-2189.

Bonnet, D. & Dick, J. E., 1997. Human myeloid acute leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med*, 3(7), pp. 730-737.

Bossi, G. et al., 2008. Conditional RNA interference in vivo to study mutant p53 oncogenic gain of function on tumor malignancy. *Cell Cycle*, Volume 7, p. 1870-1879.

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*, Volume 68, pp. 394-424.

- Chen, E. Y. et al., 2013. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*, 15(14), p. 128.
- Cheng, L., Shen, Z. & Shou, C., 2017. Promoter hypermethylation of PIEZO2 is a risk factor and potential clinical biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 10(12), pp. 11635-11643.
- Chen, L. et al., 2012. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*, Volume 33, pp. 1437-1444.
- Clarke, M. F. & Becker, M. W., 2006. Stem cells: The real culprits in cancer?. *Sci Am*, 295(1), pp. 52-59.
- Clevers, H., 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 17(3), pp. 313-319.
- Cox, C. V. et al., 2009. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood*, 113(14), pp. 3287-3296.
- Darda, L. et al., 2015. The Role of HOXB9 and miR-196a in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 10(4).
- De Felice, D. & Alaimo, A., 2020. Mechanosensitive Piezo Channels in Cancer: Focus on altered Calcium Signaling in Cancer Cells and in Tumor Progression. *Cancers*, 12(1780).
- Díaz-López, A. et al., 2011. Expression of Human MDGA1 Increases Cell Motility and Cell-Cell Adhesion and Reduces Adhesion to Extracellular Matrix Proteins in MDCK Cells. *Cancer Microenviron*, Volume 4, pp. 23-32.
- Dick, J. E., 2009. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol*, Volume 27, pp. 44-46.
- Ebben, J. D. et al., 2010. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets*, 14(6), pp. 621-632.
- Eramo, A. et al., 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, Volume 15, pp. 504-514.
- Etem, E. Ö. et al., 2018. The increased expression of Piezo1 and Piezo2 ion channels in human and mouse bladder carcinoma. *Adv Clin Exp Med*, 27(8), pp. 1025-1031.
- Fang, X., Zheng, P., Tang, J. & Liu, Y., 2010. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*, 7(2), pp. 100-103.
- Feng, D. et al., 2009. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep*, Volume 22, pp. 1129-1134.

- Ge, J. et al., 2015. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*, Volume 257, pp. 64-69.
- Geng, J., Zhao, Q., Zhang, T. & Xiao, B., 2017. In Touch With the Mechanosensitive Piezo Channels: Structure, Ion Permeation, and Mechanotransduction. In: P. A. Gottlieb, ed. *Piezo channels*. Buffalo, NY: Academic press, ELSEVIER, pp. 159-195.
- Gerber, J. M. et al., 2012. A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38-cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(15), pp. 3571-3577.
- Ginestier, C. et al., 2007. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*, Volume 1, pp. 555-567.
- GLOBOCAN, 2020. *World Health Organization Data: Mexico*. [Online] Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
- Glumac, P. M. & LeBeau, A. M., 2018. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Trans Med*, 7(18), pp. 1-14.
- Gopalan, V., Islam, F. & King-yin Lam, A., 2018. Surface Markers for the Identification of Cancer Stem Cells. In: J. M. Walker, ed. *Cancer Stem Cells Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 17-29.
- Guo, F. et al., 2015. EML4-ALK induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell properties in H1299 non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, Volume 459, pp. 398-404.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, Volume 144, pp. 646-674.
- Haupt, Y. et al., 1997. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia*, pp. 337-339.
- Hauswirth, A. W. et al., 2007. Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123 AML stem cells. *Eur J Clin Invest*, Volume 37, pp. 73-82.
- Heymach, J. et al., 2018. Clinical Cancer Advances 2018: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*, 36(10), pp. 1020-1044.
- Hillion, J. et al., 1997. AF6q21, a Novel Partner of the MLL Gene in t(6; 11)(q21; q23), Defines a Forkhead Transcriptional Factor Subfamily. *Blood*, 90(9), pp. 3714-3719.
- Hilton, J., 1984. Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia.. *Cancer Res*, 44(11), pp. 5156-5160.

- Ho, M. M., Ng, A. V., Lam, S. & Hung, J. Y., 2007. Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched With Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res*, 67(10), pp. 4827-4833.
- Hornsveld, M., Dansen, T. B., Dereksen, P. W. & Burgering, B. M., 2018. Re-evaluating the role of FOXOs in cancer. *Semin Cancer Biol*, Volume 50, pp. 90-100.
- Huang, E. H. et al., 2009. Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis. *Cancer Res*, 69(8), pp. 3382-3389.
- Huang, Y. et al., 2013. Anticancer effects of cinnamic acid in lung adenocarcinoma cell line H1299-derived stem-like cells. *Oncol Res*, Volume 20, pp. 499-507.
- Huang, Z. et al., 2019. Loss of stretch-activated channels, PIEZOs, accelerates non-small cell lung cancer progression and cell migration. *Biosci Rep*, Volume 39.
- Huasong, L. et al., 2015. Gene target specificity of the Super Elongation Complex (SEC) family: how HIV-1 Tat employs selected SEC members to activate viral transcription. *Nucleic Acids Res*, 43(12), p. 5868–5879.
- Ishimoto, T. et al., 2011. CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc⁻ and Thereby Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell*, Volume 19, pp. 387-400.
- Jaggupilli, A. & Elkord, E., 2012. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: An enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*, pp. 1-11.
- Jang, J.-W. et al., 2017. Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life Sci*, Volume 184, pp. 25-29.
- Jan, M. et al., 2011. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *PNAS*, 108(12), pp. 5009-5014.
- Jin, L. et al., 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, 12(10), pp. 1167-1174.
- Kondo, T., Setoguchi, T. & Taga, T., 2004. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *PNAS*, 101(3), pp. 781-786.
- Koren, E. & Fuchs, Y., 2016. The bad seed: Cancer stem cells in tumor development and resistance. *Drug Resist Updat*, Volume 28, pp. 1-12.
- Kuleshov, M. V. et al., 2016. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), pp. W90-7.
- Kumazoe, M. et al., 2017. The FOXO3/PGC-1 signaling axis is essential for cancer stem cell properties of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Biol Chem*, 292(26), pp. 10813-10823.

- Kuşoğlu, A. & Avcı, Ç. B., 2019. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, Volume 681, pp. 80-85.
- Landberg, N. et al., 2016. IL1RAP expression as a measure of leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia predicts therapy outcome. *Leukemia*, Volume 30, pp. 255-258.
- Lapidot, T. et al., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, Volume 367, pp. 645-648.
- Lee, H. et al., 2020. MAM domain containing 2 is a potential breast cancer biomarker that exhibits tumour-suppressive activity. *Cell Prolif*, Volume 53, p. e12883.
- Leon, G. et al., 2016. Cancer stem cells in drug resistance lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacol Ther*, Volume 158, pp. 71-90.
- Leung, E. L.-H. et al., 2010. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS ONE*, 5(11), p. e14062.
- Lim, S. B., Tan, S. J., Lim, W.-T. & Lim, C. T., 2017. An extracellular matrix-related prognostic and predictive indicator for early-stage non-small cell lung cancer. *Nat Commun*, 8(1734).
- Litwack, E. D. et al., 2004. Identification and characterization of two novel brain-derived immunoglobulin superfamily members with a unique structural organization. *Mol Cell Neurosci*, Volume 25, pp. 263-274.
- Liu, S.-Y. & Zheng, P.-S., 2013. High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget*, 4(12), pp. 2462-2475.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
- Lodish, H., 2016. *Biología celular y molecular. (7ma ed.)*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- López, J. et al., 2012. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*, 14(48), pp. 1-14.
- Lou, W. et al., 2019. Five miRNAs-mediated PIEZO2 downregulation, accompanied with activation of Hedgehog signaling pathway, predicts poor prognosis of breast cancer. *Aging (Albany NY)*, 11(9), pp. 2628-2652.
- Majeti, R. et al., 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 138(2), pp. 286-299.

- Mak, A. B. et al., 2014. Post-translational regulation of CD133 by ATase1/ATase2-mediated lysine acetylation.. *J Mol Biol*, Volume 426, pp. 2175-2182.
- Mark, A. B., Nixon, A. M. & Moffat, J., 2012. The Mixed Lineage Leukemia (MLL) Fusion–Associated Gene AF4 Promotes CD133 Transcription. *Cancer Res* , 72(8), pp. 1929-1934.
- Marks, D. I. et al., 2013. The clinical characteristics, therapy and outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial. *Haematologica*, 98(6), pp. 945-952.
- Marschalek, R., 2011. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol*, 152(2), pp. 141-154.
- Mele, L., Liccardo, D. & Tirino , V., 2018. Evaluation and Isolation of Cancer Stem Cells Using ALDH Activity Assay. In: *Cancer Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 43-48.
- Mendoza-Almanza, G. et al., 2019. Cervical cancer stem cells and other leading factors associated with cervical cancer development (Review). *Oncol Lett*, Volume 18, pp. 3423-3432.
- Meng, L., Xu, Y., Xu , C. & Zhang, W., 2016. Biomarker discovery to improve prediction of breast cancer survival: using gene expression profiling, meta-analysis, and tissue validation. *Onco Targets Ther*, Volume 9, p. 6177–6185.
- Mizuarai, S., Yamanaka, K. & Kotani, H., 2006. Mutant p53 Induces the GEF-H1 Oncogene, a Guanine Nucleotide Exchange Factor-H1 for RhoA, Resulting in Accelerated Cell Proliferation in Tumor Cells. *Cancer Res*, Volume 66, pp. 6319-6326.
- Moccia, F., 2018. Endothelial Ca²⁺ Signaling and the Resistance to Anticancer Treatments: Partners in Crime. *Int J Mol Sci* , 19(217), pp. 1-31.
- Montovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G., 2019. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ*, Volume 26, pp. 199-2012.
- Nadal, R. et al., 2013. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*, Volume 133, pp. 2398-2407.
- Najafi, M., Farhood , B. & Mortezaee, K., 2019. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*, Volume 234, pp. 8381-8395.
- Ortíz-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), pp. 31943-31954.

- Pardo-Pastor, C. et al., 2018. Piezo2 channel regulates RhoA and actin cytoskeleton to promote cell mechanobiological responses. *PNAS*, 115(8), p. 1925–1930.
- Ranade, S. S. et al., 2015. PIEZO2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice.. *Nature (HHS Public Acces Author manuscript)*, pp. 1-26.
- Ren, F., Sheng, W.-Q. & Du, X., 2013. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers.. *World J Gastroenterol*, 19(17), pp. 2603-2611.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L., 2001. Stem Cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, Volume 414, pp. 105-111.
- Ricardo, S. et al., 2011. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*, Volume 64, pp. 937-946.
- Rimmelé, P. et al., 2015. Mitochondrial metabolism in hematopoietic stem cells requires functional FOXO3. *EMBO reports*, 16(9), pp. 1164-1176.
- Sahai, E. & Marshall, C. J., 2002. RHO–GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, Volume 2, p. 133–142.
- Sahlberg, S. H. et al., 2014. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS ONE*, 9(4), p. e94621.
- Sano, S. et al., 2009. Characterization of teleost Mdga1 using a gene-trap approach in Medaka (*Oryzias latipes*). *Genesis*, Volume 47, p. 505:513.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R. & Morrison, S. J., 2009. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*, Volume 138, pp. 822-829.
- Shi-Ming, T., 2010. *Origin of cancers. Clinical perspectives and implications of a stem-cell theory of cancer.*. New York: Springer.
- Singh, A. K. et al., 2014. Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: Updates in concept, controversies and clinical relevance. *Int J Cancer*, Volume 136, pp. 1991-2000.
- Singh, S. K. et al., 2004. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature*, Volume 432, pp. 396-401.
- Soattin, L. et al., 2016. The biophysics of piezo1 and piezo2 mechanosensitive channels. *Biophys Chem*, Volume 208, pp. 26-33.
- Sun, H. et al., 2013. CD44+/CD242 breast cancer cells isolated from MCF-7 cultures exhibit enhanced angiogenic properties. *Clin Transl Oncol*, Volume 15, pp. 46-54.

- Takaishi, S. et al., 2009. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, 27(5), pp. 1006-1020.
- Takenobu, H. et al., 2011. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification.. *Oncogene*, 30(97), pp. 97-105.
- Tarhriz, V. et al., 2019. Overview of CD24 as a new molecular marker in ovarian cancer. *J Cell Physiol*, Volume 234, p. 2134–2142.
- Templeton , A. K. et al., 2014. Cancer stem cells: progress and challenges in lung cancer. *Stem Cell Invest*, 1(9), pp. 1-18.
- Timpson, P. et al., 2011. Spatial Regulation of RhoA Activity during Pancreatic Cancer Cell Invasion Driven by Mutant p53. *Cancer Res*, Volume 71, p. 747–57.
- Tirino, V. et al., 2013. Cancer stem cells in solid tumors. an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASE J*, Volume 27, pp. 13-24.
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara , A., 2016. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), pp. 11018-11032.
- Visvader, J. E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*, Volume 469, pp. 314-322.
- Wang, K. et al., 2016. MDGA2 is a novel tumour suppressor cooperating with DMAP1 in gastric cancer and is associated with disease outcome. *Gut*, Volume 65, pp. 1619-1631.
- Wang, L., Zuo, X., Xie, K. & Wei, D., 2018. The role of CD44 and cancer stem cells Liang Wang, Xiangsheng Zuo, Keping Xie, and Daoyan Wei. In: *Cancer Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 31-42.
- Wang, X. et al., 2014. Huaier aqueous extract inhibits stem-like characteristics of MCF7 breast cancer cells via inactivation of hedgehog pathway. *Tumor Biol*, Volume 35, pp. 10805-10813.
- Weinberg, R. A., 2014. *The biology of cancer*. Second ed. New York: Garland Science.
- White , A. C. & Lowry, W. E., 2015. Refining the role for adult stem cells as cancer cells of origin. *Trends Cell Biol*, 25(1), pp. 11-20.
- Xie, Z. et al., 2021. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc*, Volume 1, p. e90.
- Yalcin, S. et al., 2008. Foxo3 Is Essential for the Regulation of Ataxia Telangiectasia Mutated and Oxidative Stress-mediated Homeostasis of Hematopoietic Stem Cells. *J Biol Chem*, 283(37), p. 25692–25705.
- Yang, H., 2016. Piezo2 protein: A novel regulator of tumor angiogenesis and hyperpermeability. *Oncotarget*, pp. 7(28):44630-44643.

- Yang, W. et al., 2019. Identification of hub genes and outcome in colon cancer based on bioinformatics analysis. *Cancer Manag Res*, Volume 11, pp. 323-338.
- Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D., 2015. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*, Volume 4, p. 1033–1043.
- Yao, T. et al., 2015. ALDH1 might influence the metastatic capability of HeLa cells. *Tumor Biol*, Volume 36, pp. 7045-7051.
- Yeo, H. et al., 2013. FoxO3 coordinates metabolic pathways to maintain redox balance in neural stem cells. *The EMBO Journal*, 32(19), p. 2589–2602.
- Yeung, T. M. et al., 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *PNAS*, 107(8), pp. 3722-3727.
- Yin, A. H. et al., 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.. *Blood*, Volume 90, pp. 5002-5012.
- Zhang, H. et al., 2019. CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes dev*, Volume 33, pp. 166-179.
- Zhou, C.-c.et al., 2017. AFF1 and AFF4 differentially regulate the osteogenic differentiation of human MSCs. *Bone Res*, 5(17044).