



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

TUMORIGENICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS
TRONCALES DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
CERVICOUTERINO EXPUESTAS A DAÑO EN EL ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**HERIBERTO ABRAHAM
VALENCIA GONZÁLEZ**

TUTOR: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ



MÉXICO, D. F. Agosto 2012



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.

TUMORIGENICIDAD *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES DE LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO EXPUESTAS A DAÑO EN EL ADN

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|----------------------------------|---|
| Dr. Alejandro García Carrancá | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |
| Dr. Jaime Iván Velasco Velásquez | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dra. Leticia Rocha Zavaleta | Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM |

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Juan José Rodríguez Mercado y el Biol. Saúl Duran, de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM en los ensayos de electroforesis en gel de células individuales.

Se reconoce la asesoría de:

Dra. Jacqueline López Gil
M. en C. Graciela Ruíz Ramírez
Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez
M. en C. Miriam C. Guido Jiménez

Durante el tiempo en que se realizó el presente trabajo fui beneficiario de CONACYT mediante la Beca No. 240105 / 345455.

PMDCB/386/2012

HERIBERTO ABRAHAM VALENCIA GONZÁLEZ
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

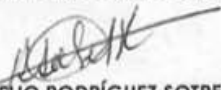
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 23 de Abril del presente, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)**, con la réplica de la tesis "**Tumorigenicidad *in vitro* de células troncales de líneas celulares de cáncer cervicouterino expuestas a daño en el ADN**", dirigida por el Dr. Alejandro García Carrancá.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente Jurado:

| | |
|------------|---------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. Vicente Madrid Marina |
| VOCAL | Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez |
| VOCAL | Dra. Marcela Lizano Soberón |
| VOCAL | Dr. Juan Carlos Gómora Martínez |
| SECRETARIO | Dra. Vilma Maldonado Lagunas |

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de Abril de 2012.


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
COORDINADOR DE ENTIDAD

C.c.p. Archivo

RRS*lgg



DEDICATORIA

A mis padres:

Abel Valencia Cedillo
Ma. Teresa González Valverde

A mis hermanos:

Angel Abel
Gisela
Briaam Gilberto
Eduardo Erasmo

A mi sobrino Alejandro Solís Valencia

“Porque al final del camino
no hay mejor satisfacción que
mirar todo lo que se ha logrado”

“No estudio por saber más, sino por ignorar menos”
Sor Juana Inés de la Cruz

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de la Facultad de Química, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto de Fisiología Celular favoreció en mi formación académica al permitirme cursar en sus instalaciones los estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y al Laboratorio de Virus y Cáncer donde fue desarrollado el trabajo experimental.

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por su dirección y su siempre disposición para atender a mis dudas y peticiones.

A mis compañeros y amigos con quien he compartido muchos momentos memorables: Martha D. Sánchez Barrios, Pedro Rosendo Chalma, Grace Ruíz Ramírez, Jackie López Gil, Vero Antonio Vejar, Silvia C. Galván H.

A mis amigos que siempre han creído en mí y me han alentado a pesar de la distancia: Alin A. Montoya Hernández, Araceli Escalera Orta, Belem Alvarado Carreño, Yurihelem Jacobo C. Samuel Romero Castillo, Blanca Cruz Cruz, Brenda Z. Hernández León, Jimmy A. Camacho Buendía, Jesús Rodríguez Ortiz, Maritza Fernández Cruz.

A Raquél López Paniagua por su auxilio en el laboratorio y su gran amistad.

A Leticia García Gutiérrez, asistente de procesos del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas – UNAM por su dedicación, paciencia y auxilio en los procesos administrativos.

A Alejandra Ma. Zaragoza Barrientos, quién sigue siendo una gran fuente de fortaleza.

A Luz Ma. Santiago López quién, aunque se incorporó al final del trayecto mantuvo fe en mí, nunca dejo de animarme, apoyarme y sobre todo, por llenar mis días de alegría y gran confianza para enfrentar las adversidades.

A mis papás y hermanos que siempre han estado en todo momento apoyándome. Gracias.

ÍNDICE

Página

| | |
|--|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| A. CÁNCER CERVICOUTERINO | 3 |
| B. CÉLULAS TRONCALES..... | 4 |
| 1. Células Troncales Normales | 4 |
| 2. Células Troncales Cancerosas..... | 6 |
| 3. Marcadores y características de las células troncales | 8 |
| 4. Resistencia a fármacos..... | 10 |
| 5. Topoisomerasa II y su inhibición | 12 |
| a. Ciclo catalítico de Topoisomerasa II | 13 |
| b. Etopósido | 15 |
| 6. Daño y reparación del Ácido Desoxirribonucleico | 17 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| IV. HIPÓTESIS | 20 |
| V. OBJETIVOS | 21 |
| A. GENERAL..... | 21 |
| B. PARTICULARES..... | 21 |
| VI. METODOLOGÍA | 22 |
| A. ESQUEMA GENERAL..... | 22 |
| B. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 23 |
| 1. Cultivos celulares..... | 23 |
| 2. Exposición al fármaco. | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Viabilidad celular | 26 |
| 4. Formación de colonias en agar..... | 27 |
| 5. Electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa | 30 |
| 6. Análisis estadísticos. | 32 |
| VII. RESULTADOS..... | 33 |
| A. LA LÍNEA CELULAR <i>HELA</i> FORMA AGREGADOS CELULARES EN ESFERAS..... | 33 |
| B. EXPOSICIÓN A ETOPÓSIDO | 34 |
| C. CÉLULAS RESISTENTES A ETOPÓSIDO FORMAN MÁS COLONIAS EN AGAR | 34 |
| D. DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN EN LOS CULTIVOS EXPUESTOS A ETOPÓSIDO | 39 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 49 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 56 |
| X. PERSPECTIVAS | 57 |
| XI. REFERENCIAS | 58 |

TABLA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|------------------|---|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| Agarosa BPF | Agarosa de bajo punto de fusión |
| Agarosa PFN | Agarosa de punto de fusión normal |
| CaCu | Cáncer cervicouterino |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| CTC | Células troncales cancerosas |
| DE | Desviación estándar |
| DMEM | Medio de Dulbecco modificado de Eagle |
| DMEM 2X | DMEM al doble de concentración de la indicada por el fabricante |
| DMEM 7% | DMEM suplementado al 7% con suero fetal bovino |
| EE | Error estándar |
| EFC | Eficiencia de formación de colonia en agar |
| Esf | Cultivo en esferas |
| IC 95% | Intervalo de confianza del 95% |
| MC | Cultivo en monocapa |
| MCS | Medio con suplemento |
| MSS | Medio sin suplemento |
| MTT | Prueba de viabilidad celular con bromuro de metiltiazoltetrazolio |
| NaCl | Solución salina isotónica de cloruro de sodio |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TOP II | Topoisomerasa tipo II |
| VP-16 | Etopósido |
| VP-16 2C | Cultivo en monocapa expuesta a VP-16 por periodos continuos sin tiempo de recuperación posterior |
| VP-16 C | Cultivo en monocapa expuesta a VP-16 por periodos continuos y dos semanas de recuperación posteriores |

| | |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación de las células troncales por potencial para diferenciarse..... | 5 |
| Figura 2. Modelo comparativo de la heterogeneidad celular en tejido normal y tumoral..... | 6 |
| Figura 3. Origen de la heterogeneidad celular del tumor | 6 |
| Figura 4. Modelos de heterogeneidad del tumor..... | 7 |
| Figura 5. Resistencia de células troncales cancerosas al tratamiento | 11 |
| Figura 6. Tipos de topoisomerasas | 12 |
| Figura 7. Actividad catalítica de TOP II..... | 14 |
| Figura 8. Complejo de ruptura TOP II-ADN-Etopósido..... | 17 |
| Figura 9. Tipos de daño generados en el ADN por genotóxicos | 18 |
| Figura 10. Esquema general de la estrategia metodológica. | 22 |
| Figura 11. Composición del agar para el ensayo de formación de colonias. | 29 |
| Figura 12 Composición de las laminillas empleadas en el ensayo cometa. | 31 |
| Figura 13 Parámetros a evaluar en el cometa..... | 31 |
| Figura 14. HeLa forma cultivos en esferas | 33 |
| Figura 15. Los cultivos resistentes a etopósido forman más colonias en agar..... | 36 |
| Figura 16. Eficiencia de formación de colonias en agar después de exponer los cultivos a etopósido... | 37 |
| Figura 17. El cultivo en monocapa logra recuperarse después de la exposición a etopósido | 38 |
| Figura 18. Expansión de células que conformar las colonias en agar | 38 |
| Figura 19. Cometas de células HeLa en monocapa | 42 |
| Figura 20. Cometas de células HeLa en esferas..... | 42 |
| Figura 21. Cinéticas de reparación en los cultivos expuestos a etopósido | 45 |
| Figura 22. Porcentaje de células dañadas en las esferas | 46 |
| Figura 23. Longitud de los cometas en las tres primeras horas de recuperación | 47 |
| Figura 24. Viabilidad del cultivo antes del ensayo cometa | 48 |

I. RESUMEN

El cáncer cervicouterino en México es un problema de salud pública al ser la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres después del cáncer de mama. La recurrencia del padecimiento es frecuente dentro de los primeros tres años posteriores a la terapia y en ocasiones un porcentaje considerable se vuelve refractario o resistente a los procedimientos necesarios para eliminarlo nuevamente.

Un modelo reciente que explica este fenómeno se basa en la existencia de una subpoblación celular que forma parte del tumor. Esta subpoblación está conformada por las denominadas células troncales cancerosas o células iniciadoras de tumor que poseen características biológicas diferentes al resto de la población. Al igual que los tejidos normales, la población que conforma el tumor es originada por células con capacidad de autorrenovación y de diferenciación, pero a diferencia de las células troncales normales, las troncales cancerosas no tienen control homeostático.

Entre las características de las células troncales se encuentra su habilidad de reparar daños en el ácido desoxirribonucleico con mayor eficacia que células diferenciadas, resistiendo así los efectos de la radio o quimioterapia. En este trabajo se empleó la línea celular HeLa, derivada de cáncer cervicouterino, para obtener cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas mediante la formación de esferas o agregados esferoides que crecen en suspensión en un medio específico y son utilizados como modelo para evaluar el daño y reparación de rupturas de cadena doble en el ácido desoxirribonucleico.

Se realizó una comparación entre el crecimiento en monocapa, considerado como cultivo heterogéneo en la composición de células, y el crecimiento en esferas como cultivo

enriquecido en células troncales cancerosas o células con propiedades de troncales cancerosas. A ambos tipos de cultivo se les causó daño a nivel del ácido desoxirribonucleico generando rupturas de cadena doble por inhibición de la enzima Topoisomerasa tipo II mediante el fármaco Etopósido.

El daño fue evaluado mediante el ensayo de electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa en condiciones alcalinas y la tumorigenicidad *in vitro* de las células después del daño fue valorada mediante el ensayo de formación de colonia en agar.

Fue posible mostrar que los cultivos de células HeLa enriquecidos en células troncales cancerosas por formación de esferas tienen mayor capacidad de reparar el daño al ADN que los cultivos heterogéneos en monocapa.

II. ANTECEDENTES

A. CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer es una enfermedad derivada de alteraciones genéticas y epigenéticas, las cuales son resaltadas como el mecanismo central en su progresión en un modelo multietápico. El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más común en mujeres a nivel mundial con cerca de 500 mil nuevos casos y 250 mil muertes cada año. En México para el año 2008, por cada 100 mil mujeres, la tasa de incidencia fue de 10.06 en mujeres mayores de 15 años mientras que la de mortalidad fue de 10.24 para mujeres entre 30 a 59 años y de 41.88 en mayores de 60 años. Del año 2000 al 2010 en promedio mueren cerca de 4000 mujeres anualmente, siendo así la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres^{1,2}. Actualmente el 35% de mujeres diagnosticadas con CaCu sufren recurrencia, de estos, el 90% dentro de los 3 años después del tratamiento inicial³, por tanto es imprescindible el mejoramiento de la terapia en este padecimiento.

En tumores sólidos se ha evidenciado la presencia de una subpoblación celular denominada células troncales cancerosas (*cancer stem cell*, por su denominación en inglés) o células iniciadoras de tumor caracterizadas por su capacidad de autorrenovación, de generar y mantener la población del tumor, además de su indiferenciación. Este hallazgo ha creado nuevos enfoques en la investigación sobre el cáncer^{4,5}.

En líneas celulares y tumores derivados de cáncer cervicouterino, se han identificado subpoblaciones con características de células troncales cancerosas, las cuales muestran un mayor potencial tumorigénico⁶⁻⁸.

B. CÉLULAS TRONCALES

1. Células Troncales Normales

Las células troncales se definen como células indiferenciadas, con capacidad de autorrenovación y participan en la formación de todos los tejidos que conforman a un individuo. El estudio de las células troncales se inició a principios de la década de 1970, cuando Till y McCulloch y más tarde Becker y colaboradores observaron cómo células simples de la médula ósea podían generar todos los tipos de células hematopoyéticas *in vivo*.⁹

La clasificación más común de las células troncales se basa en la potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes⁹, lo cual está relacionado con el grado de diferenciación. (Figura 1)

Las células troncales totipotenciales tienen la capacidad de dar origen a todas las células de un embrión completo; originan las tres capas germinales ectodermo, endodermo y mesodermo, así como el saco vitelino, alantoides, amnios y corion que constituyen los tejidos extraembrionarios. Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito, formando la célula diploide que se conoce como cigoto, la cual se caracteriza por ser totipotencial.

Las células troncales pluripotenciales, que se derivan del embrioblasto, también llamado masa celular interna del blastocito, son capaces de formar todas las células de los tejidos embrionarios; es decir, cualquier tipo de célula que se encuentre en un individuo, aunque no son capaces de originar un individuo entero porque no pueden diferenciarse en células extraembrionarias.

Las células troncales multipotenciales poseen la capacidad de diferenciarse a un limitado linaje de células relacionadas estrechamente entre sí que formarán algún tejido específico.

Las células específicas de tejido o progenitoras son células con restricción en la expresión de su genoma a diferencia de las células diferenciadas y producen un tipo celular característico de un tejido específico⁹.

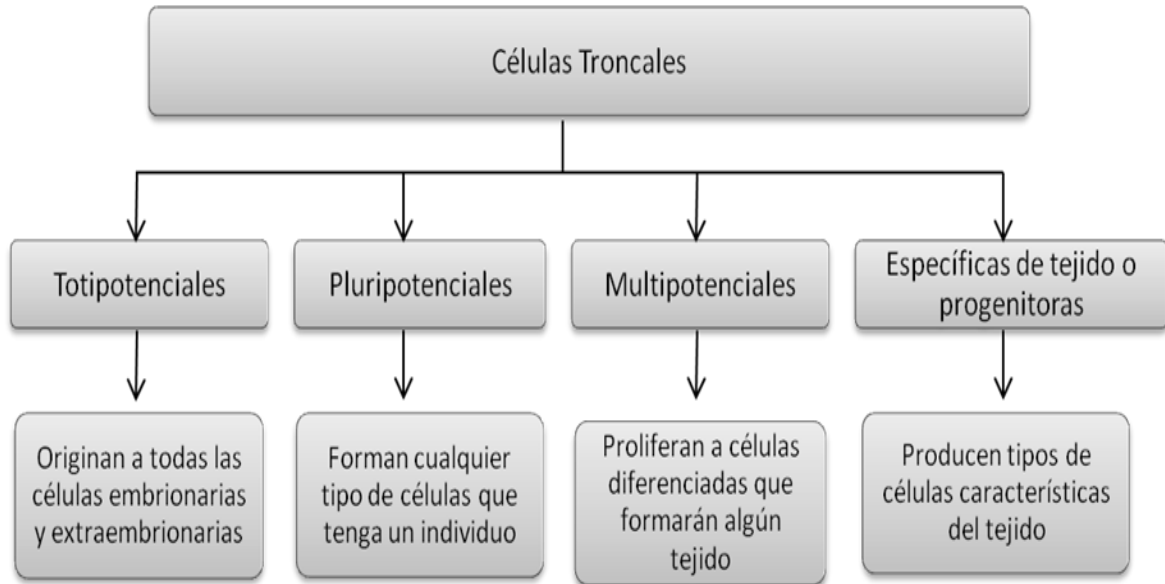


Figura 1. Clasificación de las células troncales por potencial para diferenciarse y generar diferentes linajes.

Las células troncales están definidas por tres¹⁰ principales propiedades:

- **Diferenciación.** La habilidad de dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente diversifican y especializan de acuerdo a un proceso jerárquico, mantienen la población del tejido reemplazando células dañadas o elementos ya maduros.
- **Autorrenovación.** La habilidad de formar nuevas células troncales idénticas, con potencial intacto para su proliferación, expansión y diferenciación.
- **Control homeostático.** La habilidad para modular y balancear la diferenciación, autorrenovación y proliferación de acuerdo a estímulos ambientales y genéticos.

Las células troncales son la fuente de células diferenciadas, las que generan y regeneran el tejido sano; de manera análoga, un tumor está constituido y repoblado constantemente por la progeñie de las células troncales cancerosas (Figura 2).

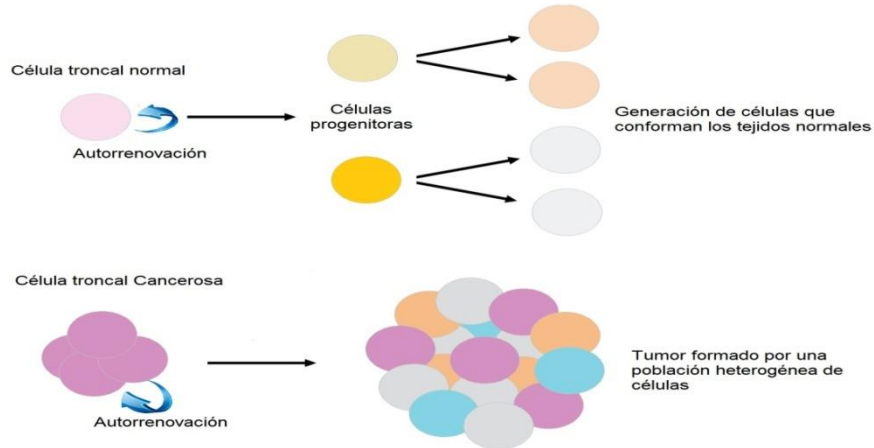


Figura 2. Modelo comparativo de la heterogeneidad celular en tejido normal y tumoral.¹¹

2. Células Troncales Cancerosas.

De la misma manera que el tejido normal es generado por células troncales normales, las células troncales cancerosas son la primera fuente de la población celular^{5,12,13} que conforman el tumor. Las células troncales cancerosas comprenden una subpoblación dentro del tumor, poseen la capacidad de autorrenovación y causan su heterogeneidad celular (Figura 3). También pueden ser definidas experimentalmente por su habilidad de regenerar un tumor durante trasplantes seriados en ratón inmunodeficiente^{11,14}.

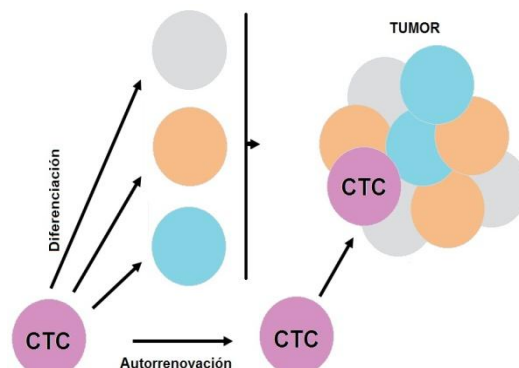


Figura 3. Origen de la heterogeneidad celular del tumor¹³.

Tradicionalmente, para el desarrollo del cáncer se ha sugerido una serie de eventos mutacionales así como modificaciones epigenéticas que dan como resultado una inestabilidad genética. El tumor es originado entonces por estos acontecimientos además de la adición de efectos causados en las células por factores ambientales⁵. La composición celular funcional y fenotípicamente heterogénea del tumor es explicada por dos modelos generales: el estocástico y el jerárquico.

De acuerdo con el modelo estocástico, las células son biológicamente equivalentes, pero su comportamiento es influenciado por factores intrínsecos y extrínsecos, es por tanto variable e impredecible. Así su actividad iniciadora de tumor no puede ser enriquecida por separación de células basada en características intrínsecas (Figura 4a). En contraste, el modelo jerárquico postula la existencia de una clase biológicamente distinta de células que difieren en habilidades funcionales y de comportamiento. Solo un subtipo de células puede iniciar el crecimiento del tumor; estas células troncales cancerosas poseen autorrenovación y dan origen a progenie no tumorigénica que constituye la mayor parte del tumor. Este modelo predice que las células iniciadoras del tumor pueden ser identificadas y purificadas desde la masa de la población no tumorigénica basados en características intrínsecas (Figura 4b).

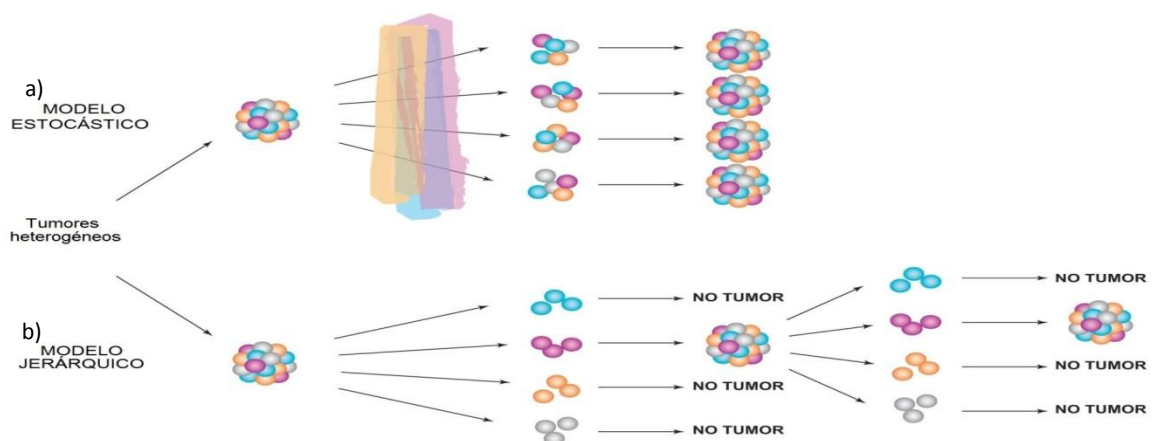


Figura 4. Modelos de la heterogeneidad del tumor. a) Los tumores son heterogéneos y cualquier célula prolifera extensivamente y forma nuevos tumores. b) Los tumores son heterogéneos y solo el subgrupo de células troncales cancerosas tiene la habilidad para proliferar extensivamente y formar nuevos tumores¹⁶.

El tejido tumoral está constituido de varias subpoblaciones conteniendo células con la capacidad de autorrenovación que dirigen el potencial tumorigénico y producen la diversidad celular¹⁷. La identificación de marcadores de superficie en estas poblaciones han permitido reconocerlas y aislarlas; la propuesta y hallazgo de los factores transcripcionales embrionarios Oct-4, Nanog, y Sox-2 como marcadores de troncalidad en células somáticas¹⁸ manifiestan la diversidad celular en el tumor. El desconocimiento de los procesos moleculares por los cuales las células mantienen sus propiedades de troncalidad amplia el campo de investigación para comprender su comportamiento.

3. Marcadores y características de las células troncales

Los factores de transcripción, Oct-4 y Nanog, son dos proteínas identificadas como esenciales para el desarrollo embrionario temprano y el mantenimiento de la pluripotencia en células troncales embrionarias. Oct-4 es un factor de transcripción de la familia POU (Pit, Oct y Unc) los cuales interactúan con el ADN a través de dos dominios de unión¹⁹. Sox-2, un factor de transcripción HMG-box, heterodimeriza con Oct-4 para regular muchos genes en las células troncales embrionarias. Oct-4, Sox-2 y Nanog poseen retroalimentación autóloga, comparten una fracción sustancial de genes blanco, muchos de los cuales codifican para factores de transcripción claves en la diferenciación y el desarrollo celular, además de regular genes activos involucrados en el mantenimiento del estado de pluripotencia²⁰. La identificación de Oct-4 en diversos tumores le ha atribuido un potencial oncogénico y juega un rol importante en el mantenimiento del estado de la troncalidad¹⁸.

Otra característica, aunque no exclusiva, de las células troncales cancerosas es el crecimiento en cultivos no adherentes o independientes de anclaje, el cual consiste en la

expansión del cultivo mediante agregados celulares en cuerpos esféricos o mejor conocidos como esferas o cultivos en esferas. El medio de crecimiento de estos cultivos se caracteriza por una restricción de elementos de proliferación y una composición específica de factores que permiten la expresión de factores involucrados en las vías de autorrenovación y de diferenciación⁶⁻⁸.

Los cultivos de esferas en suspensión han sido empleados para la identificación y caracterización de células troncales cancerosas o de células con características de troncales cancerosas en diversos tipos de cáncer²¹⁻²³.

Otra forma de crecimiento independiente de anclaje es mediante la formación de colonias en agar o ensayo de sobrevivencia clonogénico. El ensayo presenta variaciones en su técnica, como el crecimiento en matrices semisólidas de metilcelulosa o sobre agar suave; con él es posible evaluar en células individuales la capacidad proliferativa por la formación de colonias²⁴⁻²⁶.

Este tipo de crecimiento en agar suave imita, de una forma, la capacidad tumorigénica de estas células que generan una colonia²⁷. Una célula troncal cancerosa, una célula progenitora o una con propiedades similares a estas, es capaz de generar una colonia en agar, debido a que su capacidad de autorrenovación permite una extensión indefinida de la población celular durante sucesivas divisiones mitóticas^{21,28}. Esta técnica es considerada una herramienta de gran utilidad por sus ventajas de bajo costo, reproducibilidad, sencillez y relativa rapidez para la selección de células con un elevado potencial clonogénico y proliferativo; además de mostrar una buena correlación con ensayos de viabilidad.

La resistencia al tratamiento con fármacos y radiación también ha caracterizado a las células troncales cancerosas. Los mecanismos subyacentes a esta eficacia incluyen una alta

expresión de transportadores moleculares tipo ABC (*ATP-Binding Cassettes*) que expulsan los fármacos de la célula, cinéticas del ciclo celular alteradas, influencia de factores microambientales y la presencia de una maquinaria de reparación del ADN competente²⁹.

4. Resistencia a fármacos

La resistencia celular al tratamiento antineoplásico es hoy en día uno de los principales problemas en control efectivo de algunos tipos de tumores. Si bien mucho se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, se piensa que el fenómeno de resistencia a drogas puede deberse a la combinación de varios mecanismos, más que a la acción individual de cada uno de ellos.

Mediante la quimioterapia el linfoma de células grandes, el de Hodgkin, la leucemia linfocítica aguda y el cáncer testicular resultan curables. Sin embargo, aún no se han alcanzado grandes éxitos en tumores como el de ovario, el carcinoma de células pequeñas del pulmón, los mielomas, el linfoma no-Hodgkin, y en los cánceres de mama y cervicouterino en estadios avanzados. Tumores en los que generalmente se obtiene una buena respuesta al inicio de la quimioterapia comúnmente se vuelven resistentes a los agentes antineoplásicos a tal grado que causan irremediablemente la muerte del paciente³⁰.

La falta de respuesta a fármacos está relacionada con diversos factores a considerar como los eventos farmacocinéticos, la biología y el tipo de tumor, la respuesta intrínseca del paciente, la ubicación del tumor en sitios inaccesibles al fármaco y la resistencia celular a los fármacos; siendo este último es el obstáculo más importante para un tratamiento exitoso contra el cáncer³⁰. La evasión de los efectos de los fármacos es una propiedad también atribuida

a las células troncales cancerosas, las cuales persisten en los tumores después del tratamiento debido a que no está dirigido a ellas o sus propiedades no permiten el fármaco tenga éxito.

Al permanecer las células troncales cancerosas en los tumores, esta pequeña subpoblación puede repoblar el tumor dando lugar a la recurrencia tumoral desarrollando una nueva población resistente al tratamiento con fármacos o radiación, incluso puede causar metástasis después de la terapia aún cuando la mayoría de las células cancerosas parecen estar exterminadas^{4,31}. Una terapia dirigida a células troncales cancerosas aseguraría su erradicación y facilitaría la eliminación del resto de la población tumoral (Figura 5).

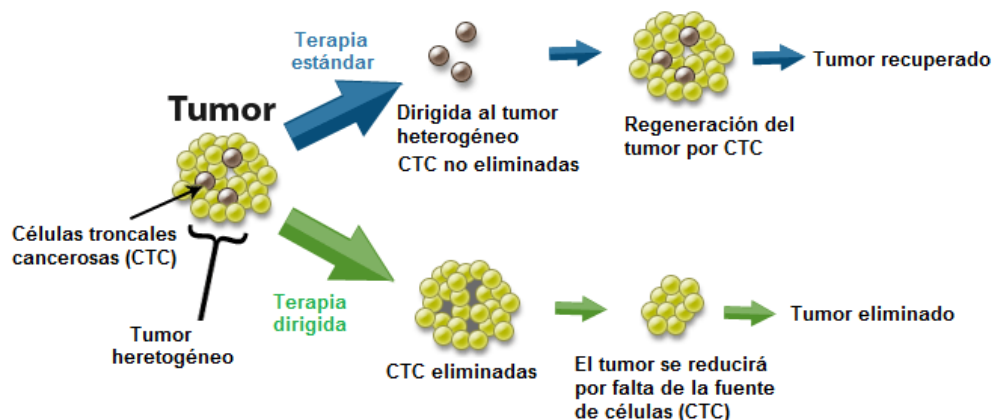


Figura 5. La resistencia de células troncales cancerosas al tratamiento evita su erradicación permitiendo la repoblación del tumor. Su erradicación favorece la eliminación posterior del resto de la población tumoral³¹.

¿Pero hasta qué nivel de daño son capaces de resistir las células cancerosas o específicamente las células troncales cancerosas? Para ello, es posible causar un efecto a nivel del ADN, por ejemplo, provocando rupturas de cadena doble a lo largo de la hélice del ADN inhibiendo la enzima Topoisomerasa II. Entre las sustancias con actividad de inhibición del proceso catalítico de la topoisomerasa II se encuentra el fármaco Etopósido como el de mayor empleo en la quimioterapia.

5. Topoisomerasa II y su inhibición

Las Topoisomerasas son enzimas esenciales para el metabolismo del ADN y se denominan DNA Topoisomerasas, estas enzimas catalizan cambios en la topología del genoma mediante rupturas transitorias sobre una o ambas cadenas, ajustan el superenrollamiento, una clave crucial para los procesos celulares como la replicación y la transcripción. Existen dos tipos de topoisomerasas, tipo I y tipo II, cada una emplea un mecanismo diferente³²⁻³⁴. La DNA Topoisomerasa tipo I (TOP I) es una proteína monomérica de 100 kDa en mamíferos que es capaz de relajar positiva y negativamente los superenrollamientos del ADN sin la presencia de energía. TOP I hace una muesca sobre una hebra del ADN y pasa la hebra intacta por esta brecha para luego ligarla (Figura 6a). La DNA Topoisomerasa tipo II (TOP II) es una proteína homodimérica de 170 KDa por subunidad; TOP II hace una ruptura en la hélice, creando así un portal por el cual pasa un segundo segmento de la hélice (Figura 6b).

TOP II es una enzima ubicua en todos los tipos celulares, en donde es esencial para el desenrollamiento de las cadenas de ADN entrelazadas que se presentan durante los procesos celulares³².

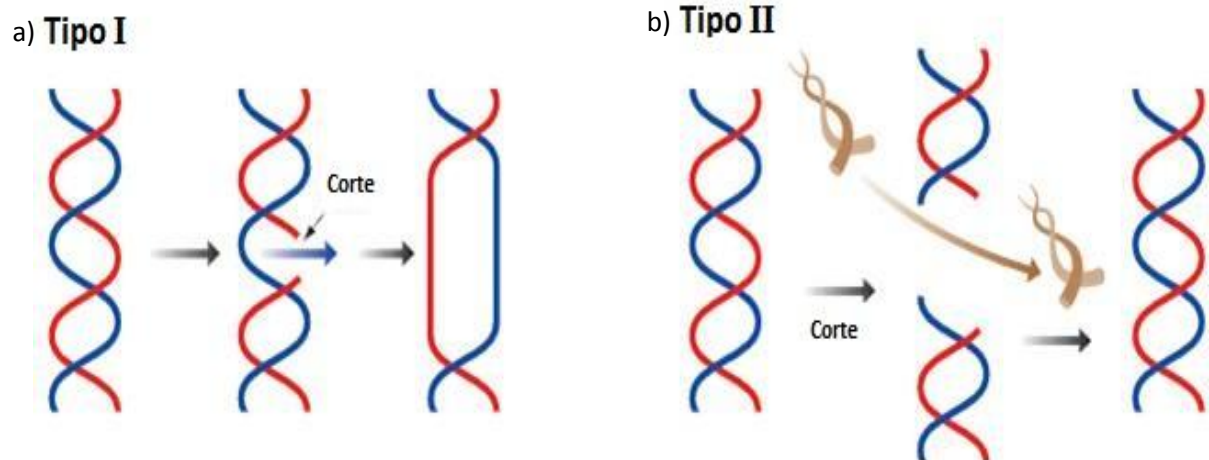


Figura 6. Existen dos tipos de topoisomerasas. a) La topoisomerasa tipo I realiza el corte sobre una sola cadena y relaja la tensión topológica cruzando la otra cadena a través de la brecha. b) La tipo II hace el corte en ambas cadenas creando un portal por el cual pasa otro segmento de ADN que libera la tensión. Las cadenas son ligadas inmediatamente.

a. Ciclo catalítico de Topoisomerasa II

La Topoisomerasa II es la responsable de liberar la tensión topológica en el ADN durante los procesos replicación, transcripción y recombinación, así como en la mitosis.

Como resultado de su mecanismo catalítico, la TOP II puede relajar moléculas de ADN superenrolladas y también puede remover de él nudos y marañas, que son común encontrarlos en el genoma. Estas funciones hacen que la TOP II sea esencial para la sobrevivencia de la célula. En ausencia de TOP II, las células no pueden segregar las cromátidas hermanas y como resultado de esta falla mitótica la célula muere.

Para hacer pasar una hélice del ADN a través de una ruptura transitoria de la doble cadena de ADN el ciclo catalítico de TOP II puede ser dividido en seis etapas^{33,34} (Figura 7):

- TOP II inicia el ciclo catalítico interaccionando de manera no covalente al sustrato ADN, tres propiedades de la doble hélice están implicadas de manera directa en el reconocimiento: su estructura primaria, la secuencia nucleotídica y su estructura topológica
- En presencia de un catión divalente, Mg^{2+} *in vivo*, se estabiliza el complejo Enzima–ADN por enlaces covalentes y se genera una ruptura transitoria de la doble cadena. Cada subunidad del enzima forma un enlace covalente en extremo 5' a través de un enlace fosfotirosilo, este complejo covalente entre ADN y TOP II es nombrado “complejo de ruptura”, estableciéndose un equilibrio entre un complejo de ruptura y uno de no ruptura al verse favorecida la ligación de la hendidura (la relación entre el complejo de ruptura sobre el de no-ruptura es de aproximadamente 1/99) manteniéndose así la integridad del ADN.

- Al enlazarse dos moléculas de ATP (Trifostafato de Adenosina), la enzima sufre un cambio conformacional que desencadena el pasaje de la segunda cadena a través de la ruptura transitoria generada. La velocidad de pasaje es muy rápida.
- Después del pasaje ocurre la ligación de la cadena rota. Una vez que el paso de las hélices de ADN se llevó a cabo, TOP II, establece de nuevo el equilibrio entre el complejo de ruptura/no ruptura favoreciéndose la ligación de la cadena, ahora el complejo de no ruptura es de 3 a 5 veces más estable que el complejo que se forma antes del desplazamiento de la cadena de ADN.
- Con la liberación de ATP TOP II se vuelve a su conformación inicial, permitiendo la liberación de las cadenas.
- TOP II libera las hebras de ADN y con su conformación original puede reiniciar el ciclo catalítico.

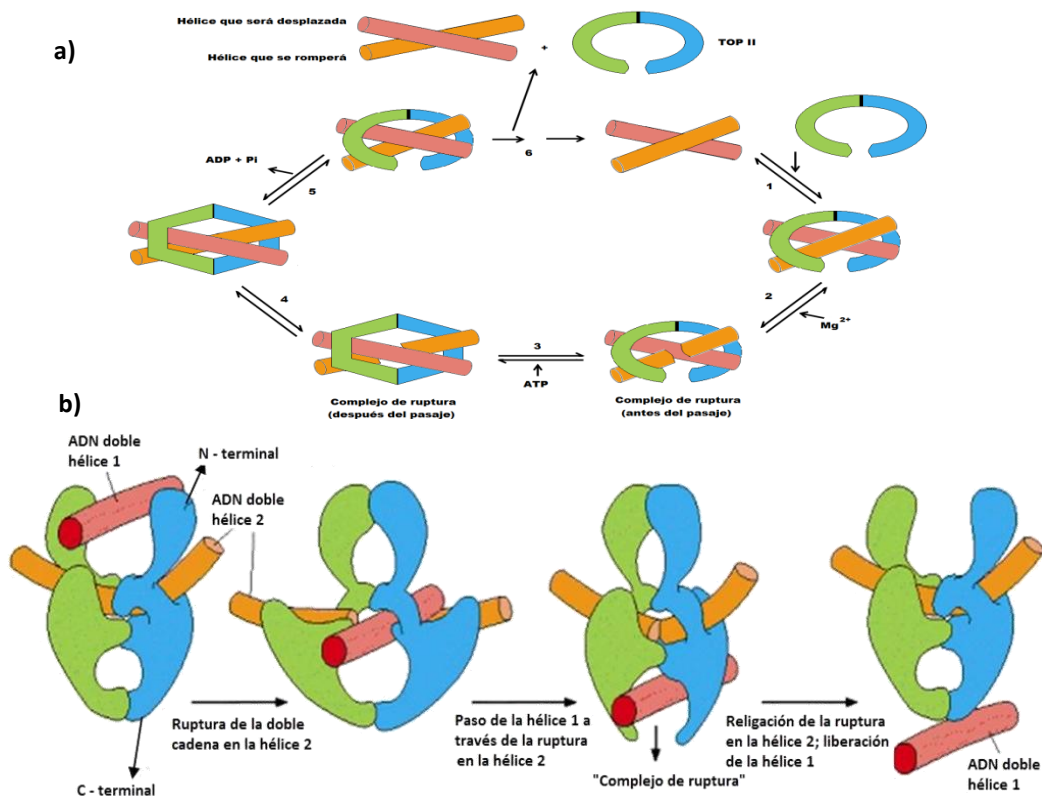


Figura 7. Actividad catalítica de TOP II. a) Ciclo catalítico. b) Complejo de ruptura³³.

b. Etopósido

Etopósido, abreviado como VP-16, es un derivado glucosídico semisintético de podofilotoxina. Este producto natural se encuentra en la planta *Podophyllum peltatum*, comúnmente conocida como Mandrágora americana, Limón silvestre o Manzana de mayo³⁵.

Su nombre sistemático IUPAC es *4'-demethyl-epipodophyllotoxin 9-[4,6-O-(R)-ethylidene-beta-D-glucoopyranoside], 4' -(dihydrogen phosphate)*. Entre sus propiedades de solubilidad, es muy soluble en metanol y cloroformo, ligeramente soluble en etanol y poco soluble en agua y éter; su solubilidad en agua aumenta por medio de disolventes orgánicos, soluciones de dextrosa y cloruro de sodio isotónicas. Su fórmula molecular es $C_{29}H_{32}O_{13}$ con un peso molecular de 588.55 g/mol³⁵.

VP-16 es actualmente el fármaco más importante en quimioterapia del cáncer. Constituye una parte estándar y esencial en el tratamiento del cáncer y notablemente en cáncer de pulmón de células pequeñas y testicular. Algunas veces es usado como único agente en quimioterapia, aunque es comúnmente asociado con otros agentes antitumorales como el cisplatino, carboplatino o ciclofosfamida en regímenes de quimioterapia combinada³³.

Desde principios del año 2000, VP-16 se ha convertido en un componente estándar de las combinaciones utilizadas en primera línea para el cáncer de células germinales^{35,36}. El etopósido sustituyó a vinblastina en primera línea³⁷ después de la demostración de una eficacia equivalente asociadas con una tolerancia superior³⁸. En consecuencia, la combinación de bleomicina, etopósido, cisplatino se utiliza comúnmente en este tipo de cáncer con los porcentajes de respuesta que alcanza hasta un 80%^{38,39}.

En combinación con otros agentes antineoplásicos, etopósido ha demostrado ser especialmente eficaz contra el cáncer de pulmón de células pequeñas⁴⁰. Etopósido puede

sustituir a doxorubicina o vincristina⁴¹ en el régimen de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina sin pérdida de eficacia. La combinación sinérgica de etopósido y cisplatino también representa un tratamiento eficaz contra este tipo de tumores⁴⁰, este régimen asociado con la radioterapia da un alto porcentaje de respuesta completa en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas limitada^{40,42}.

VP-16 es uno de los agentes más potentes contra los linfomas⁴³. Es una parte integral de los regímenes utilizados en la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no-Hodgkin⁴⁴. El tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda⁴⁵ y el sarcoma de Kaposi⁴⁶, una enfermedad asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, constituyen las otras aplicaciones importantes de etopósido. Además, una limitada actividad también se ha demostrado, por lo general en combinación, en contra de células no pequeñas de cáncer de pulmón^{44,47} y tratados previamente de cáncer de mama^{48,49}.

En Japón, VP-16 se ha utilizado en la clínica de varios tumores ginecológicos malignos, como el coriocarcinoma, el adenocarcinoma de endometrio y el adenocarcinoma de cuello uterino. En formulación oral se ha utilizado para tratar a pacientes con carcinoma de células escamosas de cuello uterino avanzado, por lo general como un medicamento de quimioterapia en el tratamiento del tumor en latencia. *In vitro* se ha concluido que VP-16 se puede administrar en cáncer cervical escamoso avanzado después de la finalización de la radioterapia⁵⁰.

Etopósido es un inhibidor de Topoisomerasa II uniéndose al complejo Enzima-ADN, inhibiendo la ligación de la ruptura después del cruce de la cadena doble íntegra^{33,51} (Figura 8).

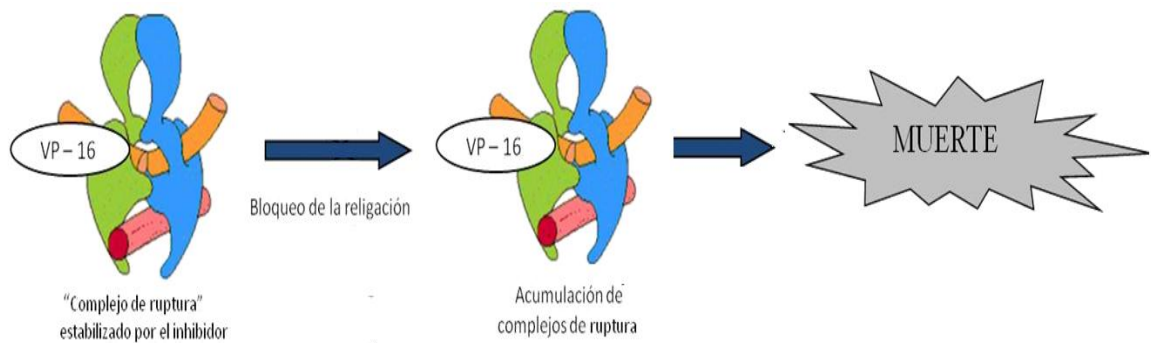


Figura 8. Complejo de ruptura TOP II-ADN es estabilizado por etopósido evitando la ligación de las cadenas rotas aumentando el nivel de rupturas de cadena doble causando la muerte celular³³.

6. Daño y reparación del Ácido Desoxirribonucleico

El daño al ADN es un evento muy común en la vida de una célula y base de la evolución, una inadecuada reparación da lugar a mutaciones, muerte celular, muerte del tejido u órgano involucrado, proliferación descontrolada e incluso cáncer. Las lesiones en el ADN inducen varias respuestas celulares que permiten hacer frente a los daños y eliminarlos o minimizarlos (Figura 9), de no ser posible la reparación, el proceso de muerte celular es activado con la finalidad de prescindir de células con daños en el ADN^{52,53}.

Entre las respuestas se incluyen: a) la activación de puntos de control de daño, lo que detiene la progresión en el ciclo celular con el fin de permitir reparar los daños y prevenir su transmisión a las nuevas células; b) una respuesta transcripcional, lo que provoca cambios en el perfil de transcripción; c) restauración de los daños, permitiendo la integridad y continuidad de la hélice del ADN; d) la apoptosis, como mecanismo de eliminación en gran medida de las células seriamente dañadas.

Los puntos de control durante el ciclo celular, para detectar los daños, emplean proteínas sensoras tales como ATM, ATR, el complejo Rad 17-RFC y el complejo 9-1-1 para iniciar las cascadas de transducción de señales que emplean Chk1 y Chk2, Ser/Thr cinasas y Cdc25 fosfatasa. Los transductores de señal activan p53 y desactivan las cinasas dependientes

de ciclinas para inhibir la progresión del ciclo celular de G1 a S (punto de control G1/S), la replicación del ADN (punto de control intra-S) o el avance de G2 a la mitosis (punto de control G2/M)⁵³.

Los complejos mecanismos de reparación son activados según el tipo de lesión ocasionada. Estos procesos son la reparación por escisión de base y por escisión de nucleótidos, reparación por recombinación homóloga y por unión de extremos no homólogos, además de Mismatch y reparación directa. Su función es el mantenimiento de la integridad del genoma.

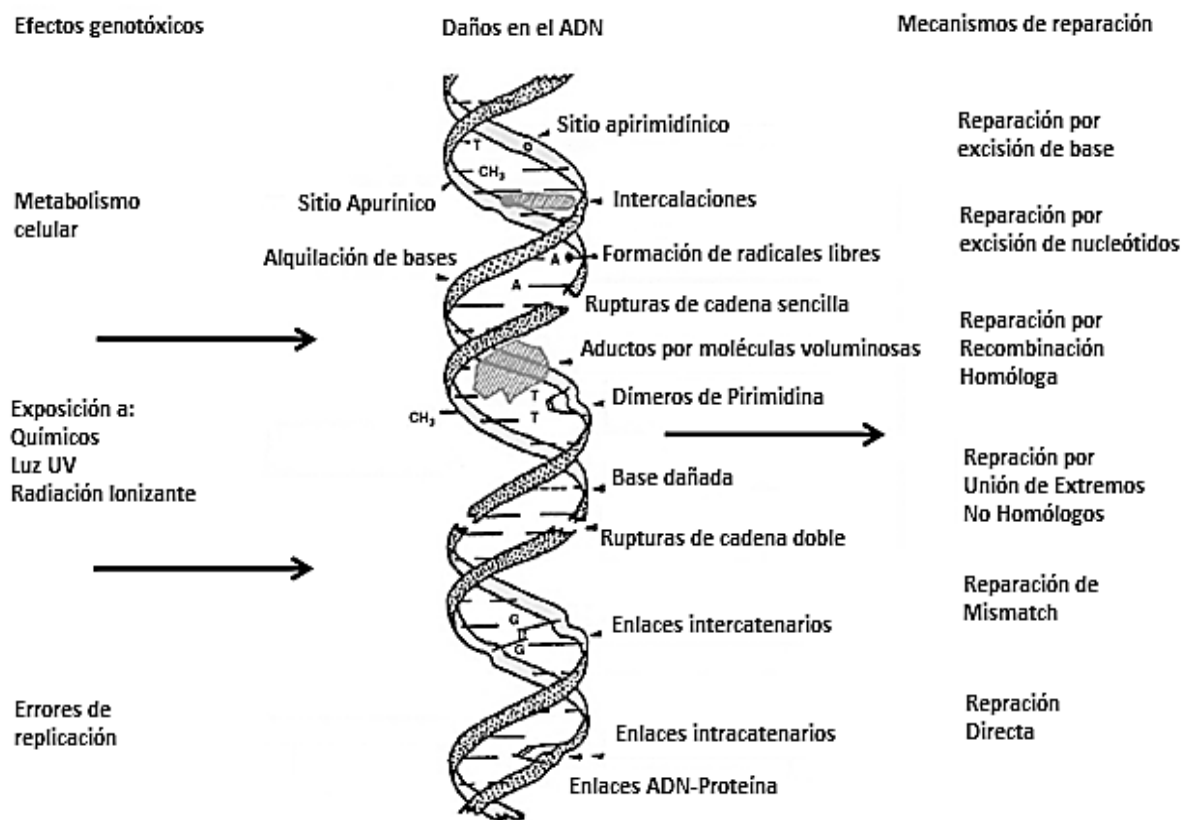


Figura 9. Los tipos de daño generados en el ADN son resultado de procesos celulares o de factores externos genotóxicos. Los mecanismos de reparación son activados de acuerdo a la lesión ocasionada⁵².

Para la excepcional capacidad de autorrenovación, el potencial de diferenciación y la proliferación celular, la expresión genómica de las células troncales se encuentra altamente regulada y se debe mantener la integridad del genoma. Bajo efectos genotóxicos endógenos y

exógenos continuos, una inadecuada reparación produce acumulación de errores en el ADN, lo que dirige la transformación de las células, su proliferación y originando células troncales cancerosas, las cuales producen la población heterogénea tumorales^{10, 54-57} y resistente a los agentes antineoplásicos⁵⁸.

Entre los diversos métodos para la identificación de daño en el ADN por rupturas, sitios AP (apurínicos, apirimídicos), aductos o interacciones ADN-ADN o ADN-proteína así como rupturas simples asociadas con mecanismos de reparación, la electroforesis en gel de células individuales es un método adecuado por su sensibilidad. Este ensayo, que suele denominarse ensayo cometa, permite identificar rupturas en la cadena de ADN en células individuales, constituyendo así un instrumento de suma utilidad⁵⁹.

Las células de interés, embebidas en un gel de agarosa y colocadas sobre un portaobjetos, son lisadas por medio de detergentes y altas concentraciones de sal, el ADN liberado es sometido a la acción de un campo eléctrico. Si existen rupturas en el ADN, pequeños fragmentos migran hacia el ánodo y observándolos al microscopio el material genético de las células adquiere la apariencia de cometas con una cabeza que representa la región nuclear seguido de los fragmentos de ADN simulando la cola del cometa⁵⁹⁻⁶¹.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento sobre las células troncales tiene una gran importancia tanto para el entendimiento de la renovación de los tejidos normales como de los tejidos tumorales; aún se desconocen muchos aspectos relevantes sobre su comportamiento biológico.

La ruptura de cadena doble de ADN tiene un efecto sobre la viabilidad celular, la acumulación de este tipo de estructuras en la célula desencadena su muerte; conocer si la célula troncal cancerosa es resistente a estos efectos posibilita redireccionar la terapéutica sobre los tejidos tumorales. Así, el desarrollo de conocimiento de las vías moleculares involucradas permitiría abordar el problema con nuevos métodos o estrategias terapéuticas.

La pregunta a responder es:

¿Los cultivos enriquecidos en células troncales de líneas celulares de cáncer cervicouterino son más eficientes en la reparación de daño al ADN que las células del cultivo heterogéneo?

IV. HIPÓTESIS

Los cultivos enriquecidos en células troncales de líneas celulares de cáncer cervicouterino poseen mecanismos más eficientes para reparar la ruptura de la doble cadena de ADN que las células que componen el cultivo heterogéneo.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

1. Determinar si los cultivos enriquecidos en células troncales de líneas celulares de cáncer cervicouterino son más resistentes a la ruptura de la doble cadena del Ácido Desoxirribonucleico (ADN).

B. PARTICULARES

1. Evaluar el número de células troncales cancerosas en líneas celulares de cáncer cervicouterino mediante la formación de colonias en agar.
2. Comparar el nivel de daño causado en el ADN por etopósido y su reparación entre las células de cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas y cultivos heterogéneos en monocapa de líneas celulares de cáncer cervicouterino.

VI. METODOLOGÍA

A. ESQUEMA GENERAL

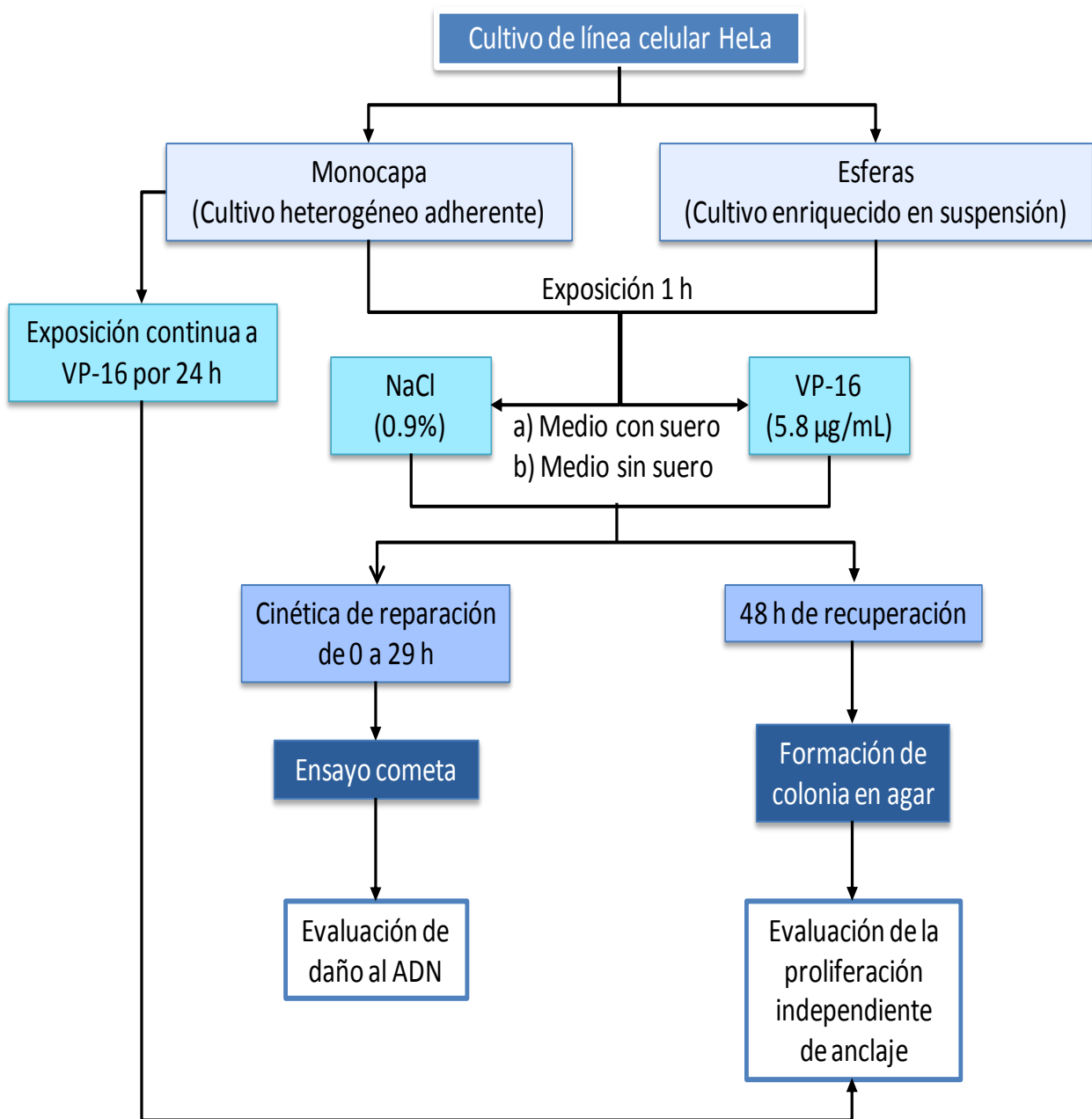


Figura 10. Esquema general de la estrategia metodológica.

B. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

- Línea celular HeLa, derivada de cáncer cervicouterino
- Medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) (Gibco)
- Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco)
- Medio de esferas *MammoCult*[®] Basal Medium Human (Stem Cell Technologies)
- Suplemento reemplazo de suero para *MammoCult*[®] Basal Medium
- Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)
- Tripsina al 0.05 %
- Antibióticos Estreptomina y Bencilpenicilina
- Agar Noble (Difco)
- Solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl 0.9%)
- ETOPOS, solución inyectable intravenosa de Etopósido (VP-16) en frasco de 5 mL con 100 mg/5mL (LEMERY, S. A. DE C. V.)

Cultivos en monocapa. Las células HeLa se cultivan en superficie adherente como monocapa (MC) empleando medio DMEM suplementado al 7% con SFB (DMEM 7%), 100 U/mL de Bencilpenicilina y 100 µg/mL de Estreptomina. Todos los cultivos se incuban a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂; se emplean con 24 a 48 horas de crecimiento y confluencia del 70 al 80 % para los ensayos. Para cosechar los cultivos se utilizó tripsina al 0.05% la cual es eliminada posterior al centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.

Formación de esferas. Para la obtención de cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas por la formación de esferas en suspensión (Esf) se empleo el medio para esferas *MammoCult* suplementado al 10 % con reemplazo de suero, 4 µg/mL de Heparina, 0.5 µg/mL de Hidrocortisona, 100 U/mL de Bencilpenicilina y 100 µg/mL de Estreptomina. De los cultivos de HeLa en monocapa se obtiene una suspensión en PBS, se toma el volumen necesario para recolectar 7 mil células y se adiciona a una caja de baja adherencia que contiene 7 mL del medio

de esferas para alcanzar una concentración final de 1000 células/mL. El cultivo se incubaba a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂ con cambio de medio cada tercer día y se emplea para los ensayos hasta después de 5 días de crecimiento formando aglomerados esféricos.

2. Exposición al fármaco.

Los medios de cultivo DMEM y *MammoCult* son suplementados con suero fetal bovino y un reemplazo de suero respectivamente. En algunos ensayos de exposición al fármaco se emplea el medio con o sin el suplemento correspondiente, por lo que las condiciones se denominan medio con suplemento (MCS) o medio sin suplemento (MSS) siendo DMEM para monocapa y *MammoCult* para esferas.

El fármaco etopósido (VP-16) es diluido en solución salina de cloruro de sodio (NaCl) según la recomendación del fabricante hasta 500 µg/mL. Previamente en el laboratorio se estableció la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del fármaco en células HeLa, la cual es de 5.8 µg/mL (10 µM) por 1 hora.

En la exposición a VP-16, inicialmente los cultivos se encuentran en medio con suplemento y el volumen necesario de fármaco diluido es adicionado directamente para obtener la concentración final de 5.8 µg/mL. Se incuban durante 1 hora a 37°C y 5 % de CO₂. Antes de agregar VP-16 a las esferas, los aglomerados son disgregados mecánicamente en la misma caja de cultivo con auxilio de la micropipeta.

Para retirar el fármaco, en la monocapa, el medio es extraído, se realizan dos lavados con PBS y se adiciona DMEM 7% fresco sin fármaco; en el caso de las esferas, los cultivos son trasvasados a tubos cónicos y centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, el medio sobrenadante es eliminado, el *pellet* se disgrega con PBS, nuevamente se centrifuga y el PBS

sobrenadante es extraído realizándose este lavado en dos ocasiones, el *pellet* ahora es disgregado en medio *MammoCult* y colocado en una nueva caja no adherente. Los cultivos son nuevamente incubados a 37°C y 5 % de CO₂ el tiempo necesario hasta su empleo para el ensayo correspondiente. Como control se emplearon cultivos en condiciones similares pero en lugar de VP-16 se utilizó un volumen igual de NaCl.

Posteriores exposiciones al fármaco se realizaron en medio sin suplemento para aclarar o confirmar resultados obtenidos en la prueba de daño al ADN. En monocapa el medio es retirado del cultivo, se realizan dos lavados con PBS y se adiciona medio DMEM sin suplemento; en las esferas el cultivo se trasvasa a un tubo cónico, se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos, el medio sobrenadante es eliminado, se realiza un lavado con PBS, se centrifuga nuevamente y se extrae el PBS, el *pellet* es disgregado con *MammoCult* sin suplemento y colocado nuevamente en la caja no adherente. El fármaco es adicionado, se incuban 37°C y 5 % de CO₂ durante 1 hora y se procede como se describió con anterioridad. Como control se siguieron las mismas condiciones de medios sin suplemento pero con NaCl en lugar de VP-16. La presencia o ausencia del suplemento en los medios de cultivo generó las siguientes condiciones.

Cultivos en:

Medio con suplemento en monocapa expuestos a VP-16
Medio con suplemento en monocapa expuestos a NaCl
Medio sin suplemento en monocapa expuestos a VP-16
Medio sin suplemento en monocapa expuestos a NaCl

Medio con suplemento en esferas expuestos a VP-16
Medio con suplemento en esferas expuestos a NaCl
Medio sin suplemento en esferas expuestos a VP-16
Medio sin suplemento en esferas expuestos a NaCl

Para la generación de cultivos resistentes a VP-16 en monocapa, a baja confluencia celular (entre 40 y 60 %) se realizaron exposiciones continuas al fármaco a 5.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguidas de periodos de recuperación durante dos y cuatro semanas: se denominó VP-16-C al cultivo expuesto por periodos de 24 horas y 48 horas de recuperación durante 15 días y después estuvo 15 días más en medio sin fármaco para recuperarse después de varios pasajes, se denominó VP-16-2C al cultivo expuesto por periodos de 24 horas y con 48 horas de recuperación durante 30 días, este cultivo no tuvo periodo largo de recuperación como en el cultivo anterior. Como control se empleó igualmente solución salina isotónica de cloruro de sodio. Después del tiempo transcurrido las células sobrevivientes fueron inoculadas en agar.

3. Viabilidad celular

Viabilidad celular mediante la prueba de MTT. Este ensayo colorimétrico mide la reducción del MTT (bromuro de 3 (4,5-dimetilicotiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio ó bromuro de metiltetrazolio). El MTT, un compuesto amarillo soluble en medio acuoso, entra a la célula viva e ingresa a la mitocondria donde por acción de la succinato deshidrogenasa es reducido a Formazan, un compuesto insoluble de color púrpura, entonces el formazan es disuelto por disolventes orgánicos y cuantificado por espectrofotometría.

Se evaluó con MTT el periodo de recuperación necesario para obtener una viabilidad mayor al 50% en el cultivo expuesto a VP-16 y poder emplearlo para el ensayo de formación de colonias en agar. La monocapa se cosechó a las 0, 24, 48 y 96 horas luego de retirado el fármaco, se disgregan las células en DMEM 7%, se siembran 5000 células por pozo en placa de 96 pozos y transcurridas 24 horas la viabilidad es evaluada añadiendo a cada pozo 50 μL de solución MTT a 5 mg/mL , se encuba por 2 a 3 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Se extrae el líquido de

cada pozo, se agregan 50 μ L de DMSO y se permite la disolución del precipitado durante 10 minutos a temperatura ambiente, la lectura de la absorbancia se realiza en un espectrofotómetro de ELISA a 570 nm.

Viabilidad celular mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Consiste en mezclar (1:1) un volumen de una suspensión de células y un volumen de solución de azul de tripano, de esta nueva suspensión se toman 20 μ L que se colocan sobre un portaobjetos y con ayuda de un cubreobjetos son dispersados, inmediatamente se observa al microscopio óptico. Las células viables se muestran redondas y brillantes mientras que las no viables se tiñen de un color azul intenso. En esta prueba se emplea también una cámara de Neubauer para realizar el conteo y conocer la concentración de células viables en la suspensión correspondiente.

La prueba de exclusión del azul de tripano se empleo para evaluar la viabilidad en el ensayo cometa y conocer la concentración de células viables que se inoculan en el ensayo de formación de colonias en agar.

4. Formación de colonias en agar

El ensayo de formación de colonias en agar consiste en la obtención de colonias independientes, producto de una serie de divisiones mitóticas de una sola célula. Se forman dos capas semisólidas de agar con medio de cultivo, una sobre otra, a diferentes concentraciones. La capa superior contiene a las células (Figura 11).

Agar con medio DMEM. La capa inferior consta en una mezcla semisólida de 0.5% de agar noble disperso en medio DMEM 7%, esta capa se prepara mezclando un volumen fundido de agar noble al 1% con un volumen de medio DMEM 2X suplementando con SFB, una vez solidificada la capa inferior se prepara la superior. La capa superior es una mezcla semisólida de

0.3% de agar noble disperso en medio DMEM 7% y contiene disgregadas las células, se prepara mezclando un volumen fundido de agar noble al 0.6% con un volumen de medio DMEM 2X, se suplementa con SFB, la concentración de células es tal que en cada pozo quedan suspendidas y disgregadas 100 células; en el caso de los cultivos en monocapa expuestos a VP-16, el número de células por pozo es de 1000.

Agar con medio *MammoCult*. La capa inferior consta en una mezcla semisólida de 0.5% de agar noble disperso en medio *MammoCult* y el suplemento correspondiente, esta capa se prepara mezclando un volumen fundido de agar noble al 2.5% con cuatro volúmenes de medio *MammoCult*, una vez solidificada la capa inferior se prepara la superior. La capa superior es una mezcla semisólida de 0.3% de agar noble disperso en medio *MammoCult*, su suplemento y contiene disgregadas las células, se prepara mezclando un volumen fundido de agar noble al 2.5% con siete volúmenes de medio *MammoCult* y el suplemento, la concentración de células es tal que en cada pozo quedan 100 células.

En ambas condiciones las células a adicionar están suspendidas y disgregadas en el medio correspondiente y podría ser importante considerar que el volumen empleado para tener la cantidad deseada de células forma parte del volumen necesario para hacer las mezclas con el agar. Para el conteo de las células se emplea la prueba de exclusión del colorante azul de tripano para asegurar que el conteo sea de células viables.

Se emplearon placas de 24 pozos y el volumen por capa fue de 800 μ L en cada pozo. Una vez inoculado y solidificado el agar, los pozos se alimentan con 400 μ L del medio suplementado correspondiente y cada vez que es consumido durante el transcurso del ensayo se adiciona medio nuevo. Las placas se incuban a 37° C y 5 % CO₂.

Las células se inoculan en el agar 48 horas después de retirado el fármaco del cultivo en monocapa o de la suspensión de esferas.

Las placas se observan directamente en el microscopio óptico. Las colonias formadas se cuentan después de un lapso de 20 días de haber sembrado las células. Se consideró como una colonia al conjunto de al menos 50 células en un mismo sitio o que mida más de 75 μm de diámetro. La eficiencia de formación de colonia (EFC) se calcula dividiendo el número de colonias formadas entre el número de células sembradas y multiplicando por cien. Las colonias no deberán estar sobrelapadas o encimadas, es decir, deben estar separadas entre sí.

Para extraer las colonias del agar, se realiza la punción con una pipeta Pasteur y con auxilio de una hoja de bisturí el agar es removido del rededor de la colonia. Para disgregar la colonia se utiliza tripsina 0.05 % y una acción mecánica con la micropipeta.

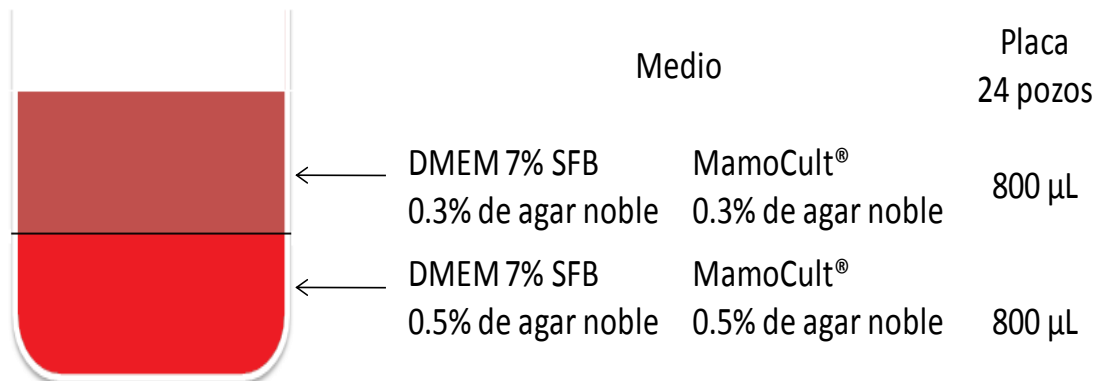


Figura 11. Composición del agar para el ensayo de formación de colonias.

5. Electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa

Con la técnica de electroforesis en gel de células individuales o también llamado ensayo cometa se construyó la cinética de reparación del ADN. Después de 1 hora de exposición al fármaco se evaluó el daño a los 0, 15 y 30 minutos, 1, 3 y 29 horas. Para monocapa se requirió un cultivo para cada tiempo debido a que se debía tripsinizar el cultivo, mientras que para las esferas no fueron necesarios pues los agregados celulares fueron disgregados y se muestreo cada vez desde el mismo cultivo.

Las células disgregadas se suspenden en PBS hasta una concentración aproximada de 500 a 1000 células/ μL de tal forma que 20 μL de esta suspensión contenga de 10^4 a 2×10^4 células los cuales se adicionan a 180 μL de agarosa de bajo punto de fusión (BPF) al 0.5%. Esta nueva suspensión se distribuye sobre dos portaobjetos, éstos previamente ya tenían solidificada una primera capa de 90 μL de agarosa de punto de fusión normal (PFN) al 1%, una tercera capa fue colocada con 95 μL de agarosa BPF al 0.5%. Para distribuir las capas de agarosa se emplearon cubreobjetos largos, para su solidificación las laminillas se colocaron sobre hielo (Figura 12).

El lisado de las células se realizó depositando las laminillas por lo menos 48 horas a 4°C protegidas de la luz en una solución de lisis a pH 10 constituida de 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 1% Triton X-100 y 10 % DMSO. Luego de la lisis y aún protegidas de la luz, las preparaciones son sumergidas durante 20 minutos en una solución alcalina a pH 13 de 300 mM NaOH y 1 mM EDTA contenida en una cámara de electroforesis, la finalidad de lo anterior fue para lograr desnaturalizar las hebras de ADN de las células lisadas. Transcurrido el tiempo se realizó la electroforesis con la misma solución durante 20 minutos a 25 Volts y 300 mA. Terminado el tiempo de electroforesis, las laminillas se transfieren a una solución a pH 7.5

de 0.4 M Tris durante 10 minutos en dos ocasiones para neutralizar las preparaciones, después se sumergen durante 5 minutos en etanol al 70% en dos ocasiones y finalmente se dejan secar a temperatura ambiente.

Para la tinción de las preparaciones se emplearon 70 μL de Bromuro de Etidio a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por laminilla y se observaron en fresco al microscopio acoplado a fluorescencia. Los parámetros a evaluar fueron la presencia de cometas, la longitud del cometa y el diámetro de la cabeza del cometa (Figura 13), para la medición se utilizó una reglilla micrométrica fijada en el ocular del microscopio.

En cada punto de la cinética, la viabilidad del cultivo se determinó por el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano. Al microscopio óptico se observaron 100 células individuales y se registró cuántas de ellas se tiñeron de un azul intenso (células no viables) y cuántas presentan una apariencia brillante (células viables).

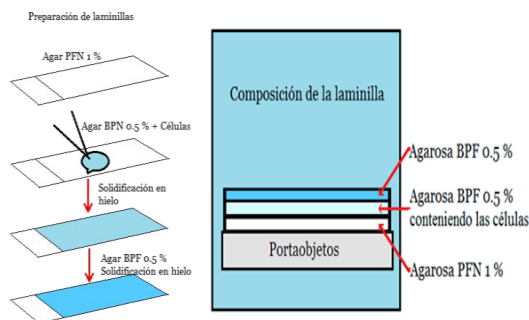


Figura 12 Composición de las laminillas empleadas en el ensayo cometa.

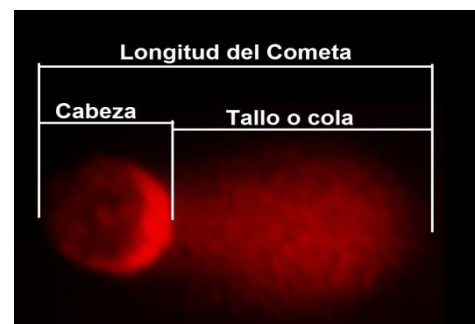


Figura 13 Parámetros a evaluar en el cometa

6. Análisis estadísticos.

Para la comparación de medias y construcción de gráficos se emplearon los software estadísticos Statgraphics™ Centurion versión XVI StatPoint Technologies, Inc. y SPSS 17 IBM Statistical Software. En cada evaluación, todo valor de P menor a 0.05 se consideró estadísticamente diferente. Se empleó como herramienta adicional el programa de Excel de la paquetería de Microsoft 2007.

En el ensayo cometa, además del análisis de varianza, también se empleó la prueba estadística de Tukey para determinar los pares de medias que no presentan diferencia estadística significativa.

VII. RESULTADOS

A. LA LÍNEA CELULAR *HELA* FORMA AGREGADOS CELULARES EN ESFERAS

Se utilizaron células HeLa, derivadas de cáncer cervicouterino, cultivadas de forma habitual en monocapa para obtener cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas por formación de esferas en suspensión. Iniciar el cultivo con una baja concentración de células (1000 células/mL) evita la formación de aglomerados muy voluminosos que son consecuencia de la adherencia y elevada proliferación celular (Figura 14). Los agregados celulares fueron empleados para las pruebas hasta el séptimo día de crecimiento.

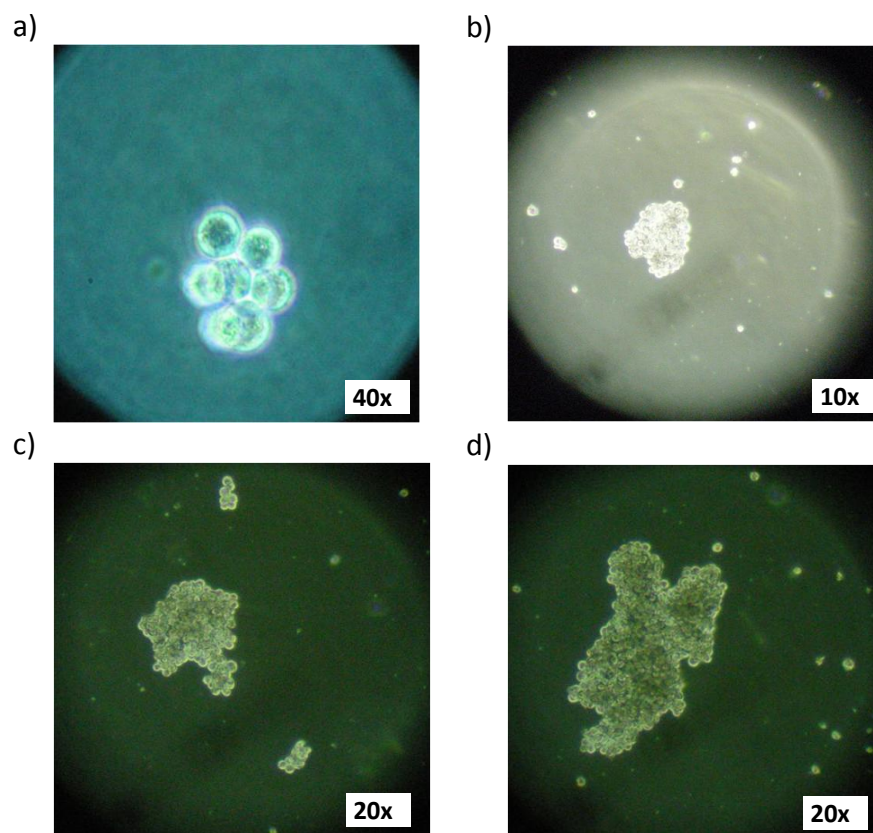


Figura 14. La línea celular HeLa forma cultivos en esferas. Los agregados celulares, enriquecidos en células troncales cancerosas, se van formando conforme crece el cultivo: a) 4, b) 7, c) 10 y d) 15 días de crecimiento. Se inicio con una concentración de 1000 células/mL.

B. EXPOSICIÓN A ETOPÓSIDO

Los cultivos fueron expuestos VP-16 para causar rupturas en la cadena de ADN. En monocapa y mediante la prueba de MTT el tiempo de recuperación se estableció en 48 horas como el necesario para poder cosechar el cultivo y realizar los ensayos correspondientes. Las mismas condiciones metodológicas establecidas en monocapa fueron usadas en los cultivos de esferas. Cosechar las células en monocapa dentro de las primeras 24 horas después de exponer al fármaco disminuye en gran medida su viabilidad.

C. CÉLULAS RESISTENTES A ETOPÓSIDO FORMAN MÁS COLONIAS EN AGAR

La eficiencia de formación de colonias en agar (EFC) se evaluó veinte días después de inoculadas las células. Se obtuvieron colonias de células provenientes de cultivos en diversas condiciones (Figura 15). La tabla 1 muestra los datos descriptivos y el intervalo de confianza del 95% en el cual oscila el promedio de la EFC de cada cultivo.

Al comparar los promedios de la EFC se encontraron diferencias entre algunas condiciones de cultivo (Figura 16). La EFC de monocapa expuesta a VP-16 (MC VP-16) es apenas de $0.25\% \pm 0.24$, mientras que la de monocapa expuesta a solución salina (MC NaCl) es de $24.10\% \pm 10.95$ existiendo una diferencia significativa con valor de p menor a 0.05 entre estos cultivos. Es evidente que el fármaco sí tiene un efecto sobre la clonogenicidad en el cultivo heterogéneo en monocapa. La EFC de las esferas expuestas al fármaco (Esf VP-16) es de $29.55\% \pm 11.90$ y para las esferas expuestas a solución salina (Esf NaCl) es de $16.35\% \pm 5.54$, obteniéndose así diferencia estadística entre estas con valor de p menor a 0.05, es decir, que el fármaco no parece tener un efecto sobre la clonogenicidad en el cultivo en esferas. Al comparar monocapa y esferas no se encuentra diferencia entre MC NaCl – Esf NaCl y MC NaCl – Esf VP-16;

pero desde el punto de vista de la acción del fármaco, las esferas sobreviven al efecto genotóxico de VP-16.

Debido a que los resultados anteriores se obtuvieron de agar con medio DMEM 7% y esperando encontrar diferencias en la EFC entre monocapa y esferas, se realizó el ensayo con medio *MammoCult* para las esferas. La EFC en agar con medio de esferas para el cultivo expuesto al fármaco (Esf VP-16 ME) fue de $10.80\% \pm 5.41$ y para el expuesto a solución salina (Esf NaCl ME) fue de $9.40\% \pm 6.26$ sin presentarse diferencia entre estas, tienen la misma eficiencia para formar colonias haya sido o no expuesto el cultivo al fármaco. Contrariamente al resultado esperado, la eficiencia fue menor en ambos casos al compararlos con los datos previamente descritos.

Los cultivos en monocapa expuestos periódicamente a VP-16 también fueron evaluados en la formación de colonia, el que fue expuesto por dos semanas con dos más de recuperación posteriores (VP-16 C) formó un mayor número de colonias con $43.13\% \pm 17.73$ que el expuesto durante las cuatro semanas sin recuperación posterior (VP-16 2C) con $1.75\% \pm 1.14$. El cultivo VP-16 C obtuvo una EFC mucho mayor que cualquiera de los otros cultivos evaluados.

Los cultivos MC NaCl generaron colonias redondas con bordes más o menos uniformes y difieren en tamaño, MC VP-16 generó colonias redondeadas con bordes definidos y tamaños similares. Ambos cultivo de esfera Esf NaCl y Esf VP-16 crearon colonias redondeadas de similar tamaño con bordes uniformes. VP-16 C generó colonias de múltiples tamaños, poco redondeados, con bordes irregulares, mientras que VP-16 2C generó en colonias más grandes, redondas con bordes más o menos redondeados. La morfología de las colonias generadas por esferas en el agar con medio *MammoCult* es similar a las generadas por estas mismas en agar con medio DMEM.

Las células en monocapa expuestas continuamente al fármaco tuvieron cambios morfológicos muy evidentes igual las colonias que fueron recuperadas desde el agar y cultivadas nuevamente en monocapa. En ambos casos, aunque la viabilidad se mantuvo, la proliferación se vio reducida, pero con el paso del tiempo y algunos pasajes ambos cultivos lograron recuperarse prácticamente en su totalidad (Figura 17 y 18)

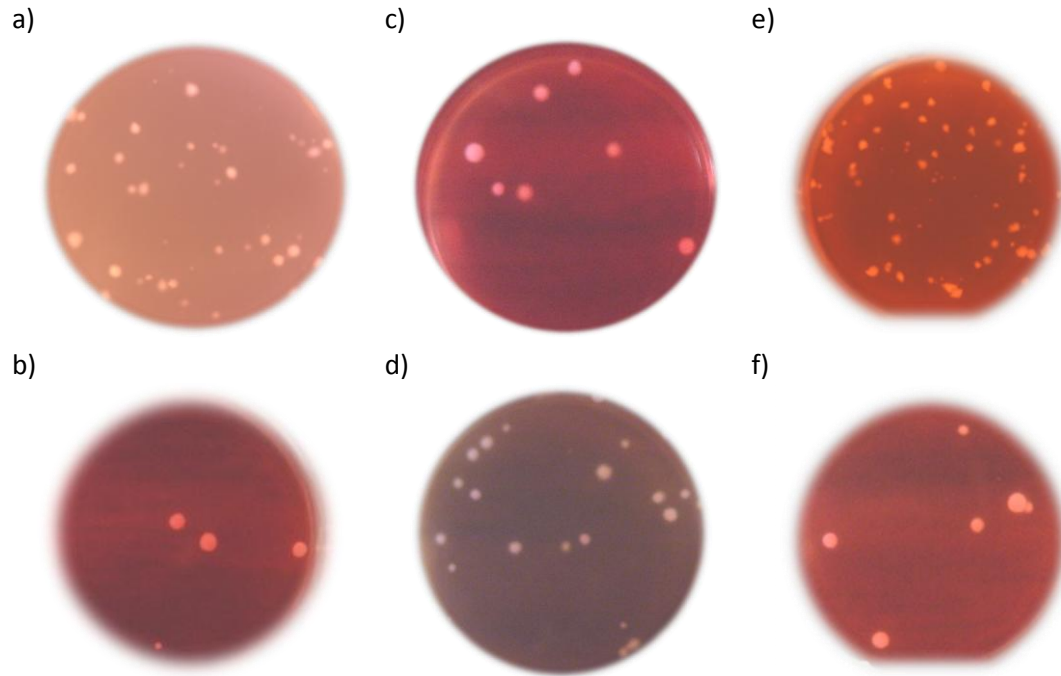


Figura 15. Las células troncales cancerosas son más resistentes a VP-16 y forman más colonias en agar. Cultivos de HeLa provenientes de a) monocapa, b) monocapa expuesta a VP-16, c) esferas, d) esferas expuesta a VP-16, e) monocapa expuesta a VP-16 por periodos de 24 horas y dos semanas de recuperación posterior, f) monocapa a expuesta al fármaco por periodos continuos de 24 horas sin tiempo de recuperación posterior. La eficiencia fue evaluada 20 días después de la inoculación, las colonias generadas por esferas podían ser evaluadas ya desde los 15 días.

Tabla 1. Las esferas muestran mayor resistencia al efecto de VP-16 que la monocapa y poseen mayor eficiencia para formar colonias en agar.

| Cultivo | | IC 95% | EFC (%) ± DE | EE |
|----------|--------------|----------------------|----------------------|-------------|
| Monocapa | VP-16 | 0.16 – 0.34 | 0.25 ± 0.24 | 0.04 |
| | NaCl | 22.63 – 25.56 | 24.10 ± 10.95 | 1.38 |
| Esferas | VP-16 | 26.96 – 32.14 | 29.55 ± 11.90 | 2.66 |
| | NaCl | 14.98 – 17.73 | 16.35 ± 5.54 | 0.66 |
| | VP-16 ME* | 8.21 – 13.39 | 10.80 ± 5.41 | 1.21 |
| | NaCl ME* | 6.81 – 11.99 | 9.40 ± 6.26 | 1.40 |

* ME, empleo de medio *MammoCult* en el agar.

NaCl, expuesto a solución salina. VP-16, expuesto a etopósido. IC 95%, intervalo de confianza del 95%. EFC, eficiencia de formación de colonias en agar. DE, desviación estándar. EE, error estándar.

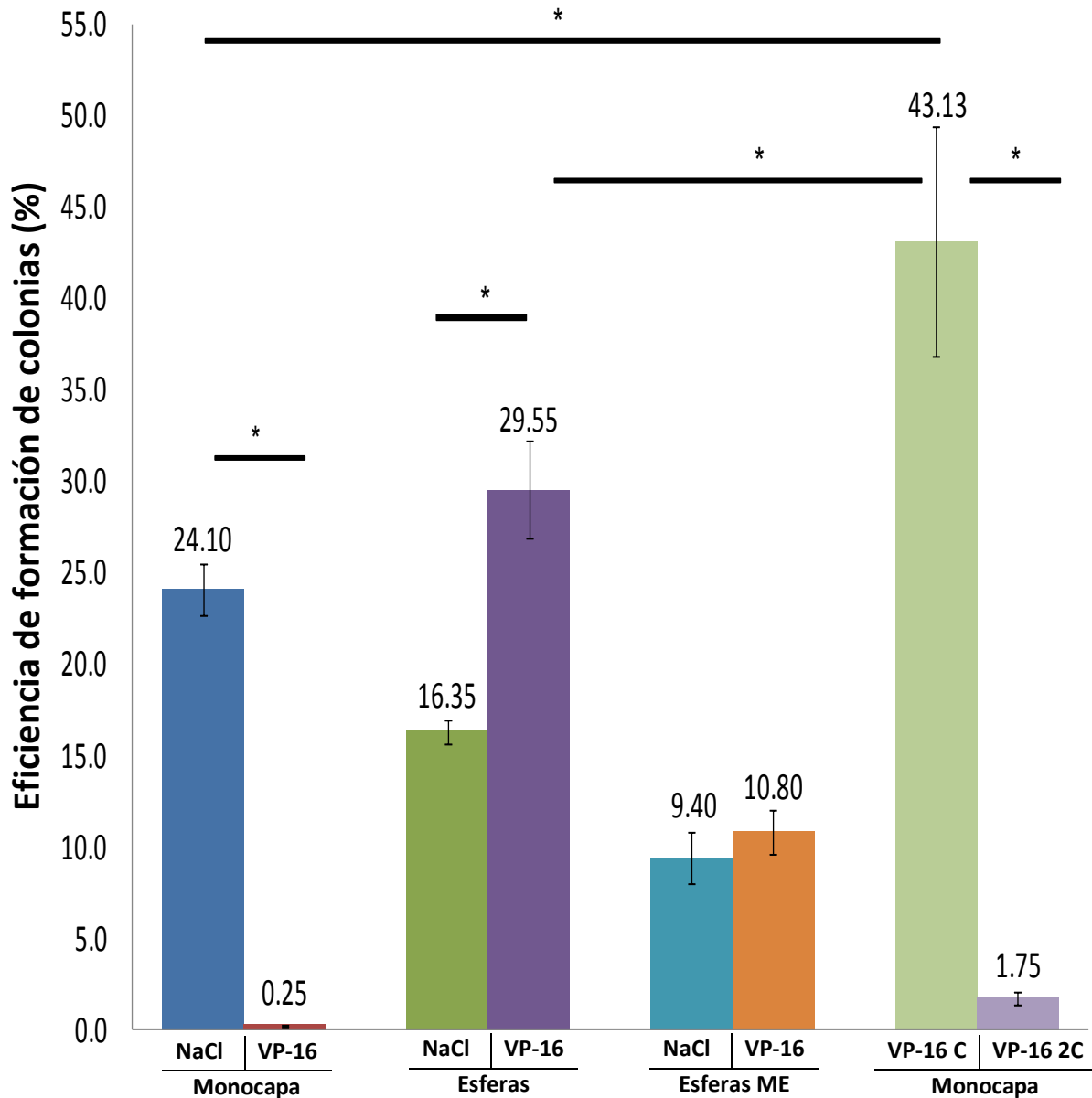


Figura 16. Eficiencia de formación de colonias en agar después de exponer los cultivos a etopósido. Los cultivos en esferas son más eficientes al formar colonias, comparando la eficiencia entre monocapa y esferas expuestas al fármaco, las esferas son más resistentes. Etopósido tiene un efecto negativo sobre la clonogenicidad en el cultivo heterogéneo en monocapa pero no sobre el enriquecido en células troncales cancerosas por formación de esferas. La presencia de la farmacoresistencia y el aumento en la clonogenicidad hace a los cultivos en esferas potencialmente más tumorigénicas.

NaCl, expuesto a solución salina. VP-16, expuesto a etopósido. ME, agar con medio MammoCult. VP-16 C, exposición continua a etopósido con recuperación posterior. VP-16 2C, exposición continua a etopósido sin recuperación posterior. * Diferencia significativa con valor de $p < 0.05$ Promedio \pm EE

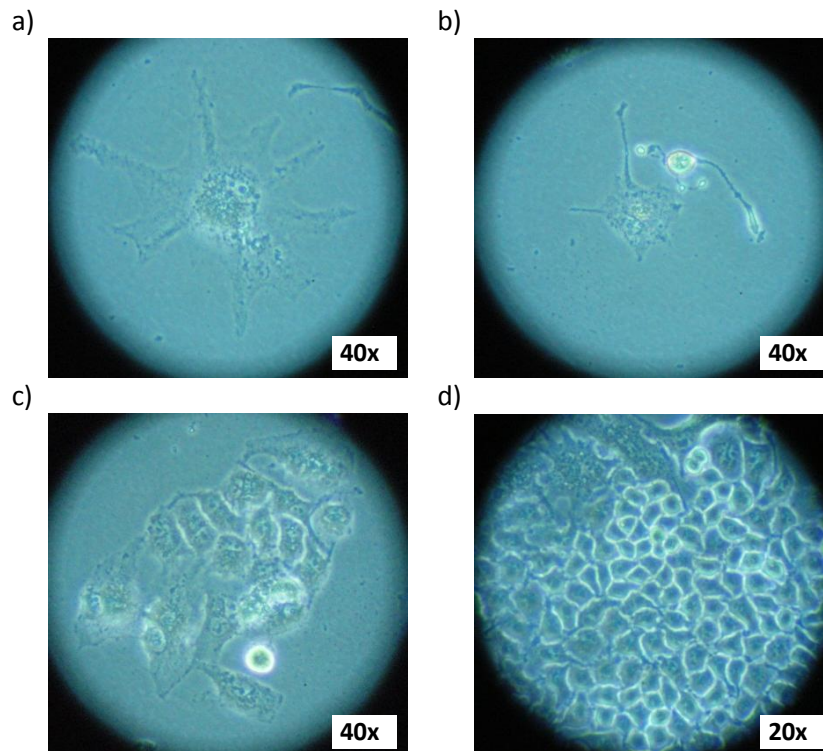


Figura 17. El cultivo en monocapa logra recuperarse después de la exposición a etopósido. Exposiciones continuas por 24 horas seguidas de 48 horas de recuperación cambiaron la morfología de las células HeLa. Permitir su recuperación posterior favorece su proliferación restableciendo su morfología habitual obteniéndose una población potencialmente resistente a etopósido.

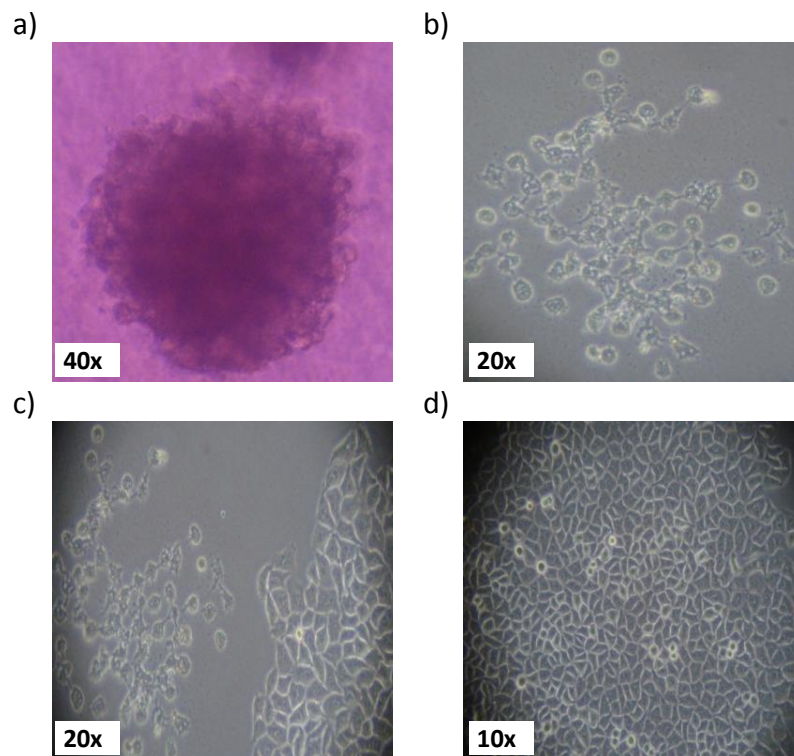


Figura 18. Expansión de células que conforman las colonias en agar. Al extraer las colonias desde el agar y crecerlas nuevamente en monocapa, las células progresan con una morfología diferente y con el paso del tiempo el cultivo restablece su morfología habitual. Las células que proliferan en agar continúan con el potencial de propagarse extensivamente.

D. DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN EN LOS CULTIVOS EXPUESTOS A ETOPÓSIDO

El daño al ADN ocasionado por la exposición de los cultivos a etopósido se evidenció mediante el ensayo de electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa en condiciones alcalinas. Se compararon las cinéticas de reparación de cultivos en monocapa y en esferas. La fragmentación del material genético se muestra por la formación de estructuras semejantes a un cometa visibles por microscopia en las laminillas empleadas en el ensayo. La estela del cometa representa fragmentos ADN con bajo peso molecular mientras que la cabeza está conformada de ADN de alto peso molecular o no fragmentado. A mayor longitud del cometa mayor daño y a mayor presencia de cometas mayor el número de células dañadas.

El ensayo se inicio con los cultivos en monocapa empleando medio DMEM suplementado durante la exposición al fármaco y solución salina, se continuó después con los cultivos en esferas con medio *MammoCult* suplementado. Debido a que los datos obtenidos no concordaban con los esperados, se decidió eliminar el suplemento de los medios de cultivo durante la exposición a VP-16 y NaCl (Figura 19 y 20).

En la Tabla 2 se muestran los datos descriptivos de los cometas obtenidos en condiciones de medio con suplemento (MCS). La longitud promedio de los cometas en la monocapa expuesta a NaCl permanece constante al tiempo cero con $43.90 \mu\text{m} \pm 14.41$ y al tiempo de 29 horas con $49.28 \mu\text{m} \pm 27.66$ con un porcentaje de células dañadas menor al 20%. El cultivo expuesto a VP-16 al tiempo cero el 97% de células presenta daño con longitud promedio del cometa de $140.41 \mu\text{m} \pm 31.73$, conforme se permite la recuperación del cultivo el porcentaje de células dañadas y la longitud del cometa disminuyen hasta el 31% y $54.76 \mu\text{m} \pm 28.75$ respectivamente a las 29 horas.

Para el caso de las esferas, la longitud del cometa en el cultivo expuesto a NaCl fue de $69.86 \mu\text{m} \pm 42.5$ a las cero horas sin ser estadísticamente diferente a $77.08 \mu\text{m} \pm 49.66$ que fue el valor obtenido a las 29 horas, el porcentaje de células dañadas es similar con 53.5% y 55.0% respectivamente. La longitud promedio del cometa a las cero horas en el cultivo expuesto a VP-16 es de $179.46 \mu\text{m} \pm 85.88$ con 82% de células dañadas, el cometa fue disminuyendo conforme el tiempo hasta llegar a $119.49 \mu\text{m} \pm 57.06$ con 77% de células dañadas a las 29 horas. En esta condición, el daño en el control no varía al inicio y al final, en el expuesto al fármaco sí hay una disminución conforme el tiempo. Los cometas generados en las esferas son de mayor tamaño que los generados en la monocapa; el daño es mayor en las esferas que en la monocapa y no presentan similitud en el proceso de reparación (Figura 21a y 21b; Figura 22a y 22b).

En la Tabla 3 se muestran los datos descriptivos de los cometas obtenidos en condiciones de medio sin suplemento (MSS), aquí el comportamiento de los cultivos fue diferente. En monocapa expuesta a VP-16 los cometas fueron mucho mayores, con longitudes mayores a los $200 \mu\text{m}$ y el 100% de células dañadas a lo largo del tiempo superan al control que en promedio no rebasan los $140 \mu\text{m}$ con 97% de células dañadas desde los 30 minutos hasta las 29 horas. En esta condición, el daño en la monocapa es grande y constante a lo largo del ensayo sin una recuperación evidente.

La exposición de las esferas a VP-16 en medio sin suplemento también genera cometas largos, pero a diferencia de la monocapa sí hay una disminución de la presencia y de la longitud del cometa. Dentro de las tres primeras horas de recuperación el cometa se reduce desde $210.53 \mu\text{m} \pm 22.56$ con el 100% de células dañadas a las cero horas hasta $93.08 \mu\text{m} \pm 37.11$ con un porcentaje de células dañadas del 69. El control presentó cometas de longitud similar a los

obtenidos por exposición al fármaco, lo que indica que los cultivos en esferas reparan con mayor eficiencia el efecto de VP-16 que la monocapa (Figura 21c y 21d; Figura 22c y 22d).

Comparando monocapa y esferas en la misma condición, a las primeras horas en las cinéticas de reparación se observa que el suplemento de cada medio tiene un efecto sobre la respuesta del cultivo al exponerse al fármaco (Figura 23a y 23b).

El daño evidenciado no se debe a muerte celular de los cultivos, a cada tiempo en la cinética de reparación se determinó la viabilidad celular a la par que se inicia el ensayo cometa empleando el método de exclusión del colorante azul de tripano. La viabilidad de los cultivos, en promedio, siempre fue mayor al 90% durante todos los puntos evaluados (Figura 24).

De acuerdo a las mediciones realizadas, las células consideradas sin daño son representadas por cometas con longitudes no mayores a 50 μm debido a que los cometas sin estela o con escasa migración de fragmentos de ADN, es decir, los núcleos o cabezas de los cometas oscilan entre los 25 y 50 μm .

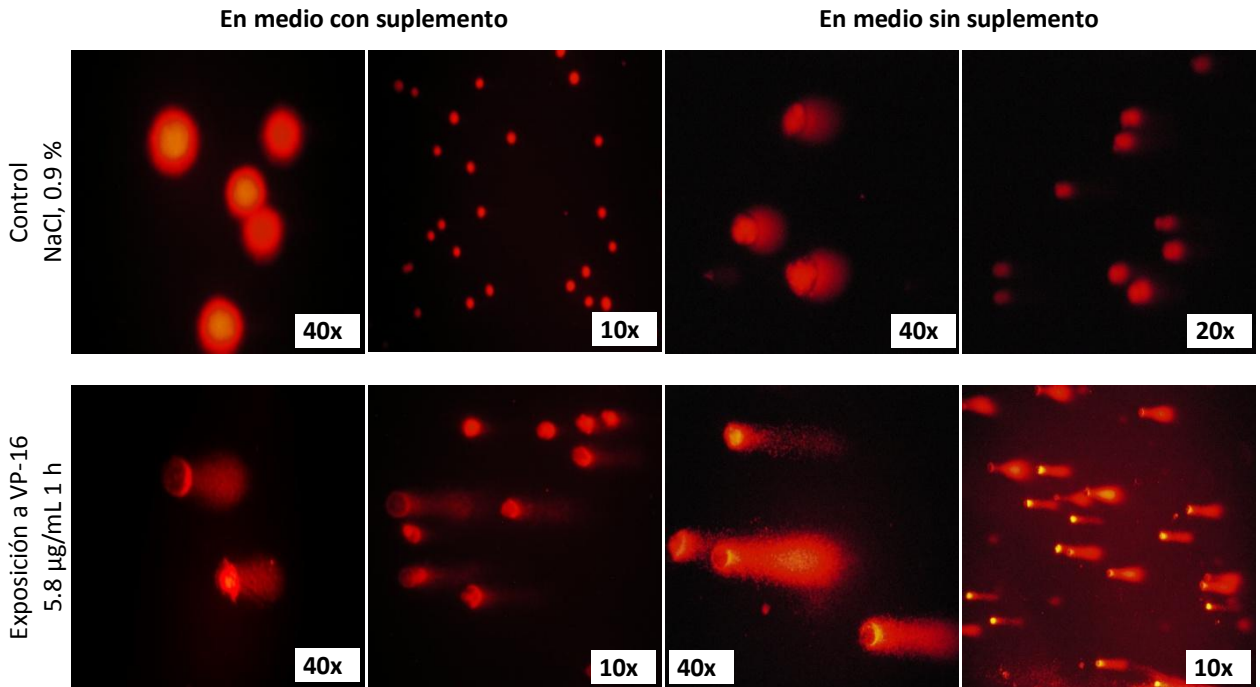


Figura 19. Cometas de células HeLa en monocapa. Se observa como lo cometas en la condición de medio sin suero aumentan su longitud incluso el control presenta cometas a diferencia de la condición de medio con suero.

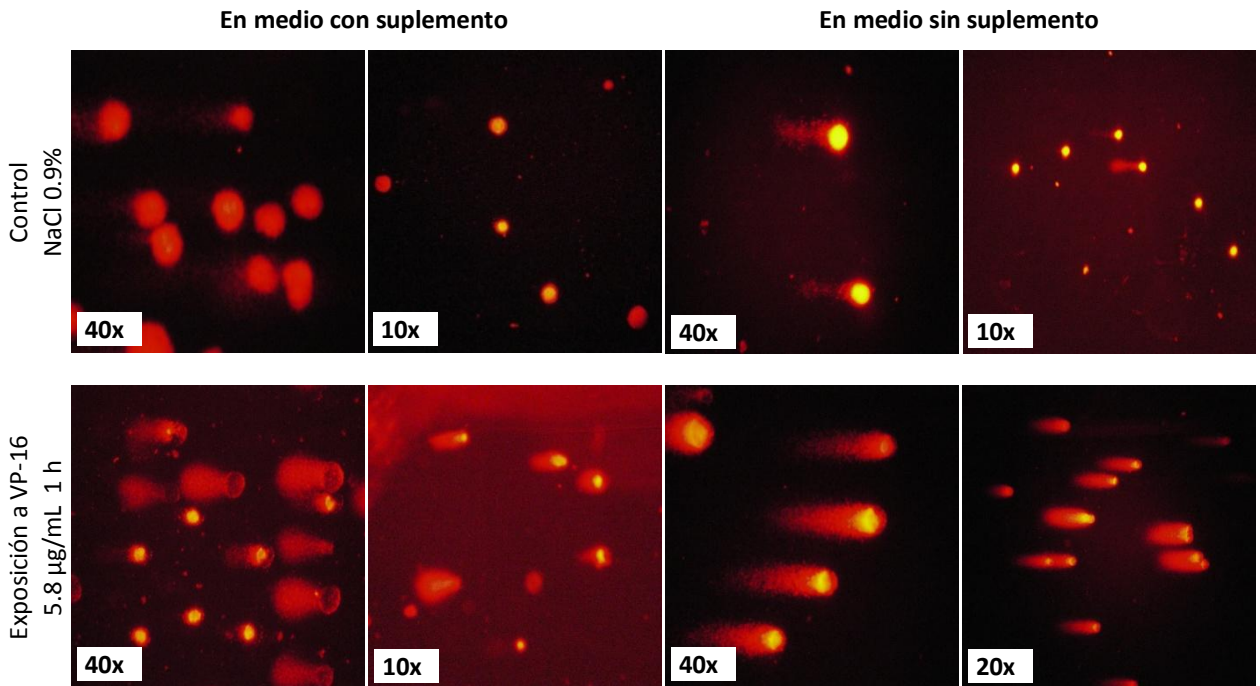


Figura 20. Cometas de células HeLa en esferas. Se observa como lo cometas en la condición de medio sin suplemento aumentan su longitud incluso el control presenta cometas a diferencia de la condición de medio con suplemento correspondiente

Tabla 2. La presencia del suplemento en el medio de cultivo durante la exposición al VP-16 tiene un efecto protector contra el daño al ADN en la monocapa. La reparación del daño se distingue por la disminución de la longitud promedio del cometa, en monocapa se observa reducción del tamaño del cometa así como del porcentaje de células dañadas, en las esferas el proceso se denota con lentitud.

| Cultivo | Fármaco | Tiempo de recuperación (horas) | Longitud promedio del cometa (μm) \pm DE | EE* | Longitud mínima y máxima encontrada (μm) | Células dañadas (%) | |
|----------------------|----------|-------------------------------------|---|--------------------------------------|---|---------------------|-------------|
| Medio con suplemento | Monocapa | NaCl | 0.00 | 43.90 \pm 14.41 | 0.83 | 25.0 – 116 | 10.7 |
| | | | 29.00 | 49.28 \pm 27.66 | 1.60 | 32.0 – 190 | 17.3 |
| | | VP-16 | 0.00 | 140.41 \pm 31.73 | 1.83 | 34.0 – 200 | 97.7 |
| | | | 0.25 | 110.67 \pm 35.88 | 2.07 | 32.0 – 250 | 87.3 |
| | | | 0.50 | 132.42 \pm 45.14 | 2.61 | 32.5 – 200 | 89.3 |
| | | | 1.00 | 74.81 \pm 40.99 | 2.37 | 32.0 – 340 | 66.0 |
| | | | 3.00 | 64.71 \pm 34.65 | 2.00 | 30.0 – 200 | 49.3 |
| | 29.00 | 54.76 \pm 28.75 | 1.66 | 32.0 – 150 | 31.0 | | |
| | Esferas | NaCl | 0.00 | 69.86 \pm 42.50 | 3.01 | 32.5 – 250 | 53.5 |
| | | | 1.00 | 105.00 \pm 44.62 | 3.15 | 25.0 – 250 | 82.0 |
| | | | 29.00 | 77.08 \pm 49.66 | 3.51 | 35.0 – 250 | 55.0 |
| | | VP-16 | 0.00 | 179.46 \pm 85.88 | 6.07 | 32.5 – 250 | 82.0 |
| | | | 0.50 | 159.95 \pm 47.18 | 3.34 | 32.5 – 250 | 95.0 |
| | | | 1.00 | 135.06 \pm 42.33 | 2.99 | 32.5 – 250 | 92.0 |
| 29.00 | | | 119.49 \pm 57.06 | 4.03 | 30.0 – 250 | 77.0 | |

Los cometas generados en las esferas son de tamaño superior a los generados en la monocapa siendo mayor el daño en las esferas que en la monocapa. No existe similitud en el proceso de reparación.

* El número de cometas evaluados fue de 300 para monocapa y 200 para las esferas.

NaCl, exposición a solución isotónica. VP-16, exposición a etopósido. DE, desviación estándar. EE, error estándar.

Tabla 3. La ausencia del suplemento en el medio de cultivo favorece el daño al ADN en monocapa pero no en las esferas. El daño es mayor en la monocapa sin lograr recuperarse mientras que las esferas logran disminuir la longitud del cometa.

| Cultivo | Fármaco | Tiempo de recuperación (horas) | Longitud promedio del cometa (μm) \pm DE | EE* | Longitud mínima y máxima encontrada (μm) | Células dañadas (%) | |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|---|---------------------|--------------|
| Medio sin suplemento | Monocapa | NaCl | 0.00 | 84.88 \pm 30.35 | 2.15 | 37.5 – 200.0 | 75.0 |
| | | | 0.50 | 145.46 \pm 35.13 | 2.48 | 70.0 – 202.5 | 100.0 |
| | | | 1.00 | 132.30 \pm 32.33 | 2.29 | 50.0 – 185.0 | 97.0 |
| | | | 3.00 | 139.30 \pm 37.30 | 2.64 | 35.0 – 200.0 | 95.0 |
| | | | 29.00 | 122.34 \pm 28.31 | 2.00 | 37.5 – 175.0 | 96.5 |
| | | VP-16 | 0.00 | 239.96 \pm 13.53 | 0.96 | 200.0 – 250.0 | 100.0 |
| | | | 0.25 | 244.25 \pm 12.89 | 0.91 | 200.0 – 250.0 | 100.0 |
| | | | 1.00 | 221.94 \pm 20.61 | 1.46 | 100.0 – 250.0 | 100.0 |
| | | | 3.00 | 221.78 \pm 23.65 | 1.67 | 125.0 – 250.0 | 100.0 |
| | | | 29.00 | 240.43 \pm 21.80 | 1.54 | 125.0 – 250.0 | 100.0 |
| | Esferas | NaCl | 0.00 | 77.80 \pm 41.98 | 2.97 | 32.5 – 200.0 | 51.5 |
| | | | 0.25 | 115.60 \pm 68.13 | 4.82 | 32.5 – 250.0 | 59.5 |
| | | | 0.50 | 146.00 \pm 19.39 | 1.37 | 37.5 – 187.5 | 99.0 |
| | | | 1.00 | 158.13 \pm 43.03 | 3.04 | 32.5 – 225.0 | 93.0 |
| | | | 29.00 | 139.59 \pm 24.21 | 1.71 | 75.0 – 200.0 | 100.0 |
| | | VP-16 | 0.00 | 210.53 \pm 22.56 | 1.60 | 155.0 – 250.0 | 100.0 |
| | | | 0.25 | 88.23 \pm 45.18 | 3.19 | 32.5 – 175.0 | 61.0 |
| | | | 0.50 | 138.20 \pm 28.66 | 2.03 | 32.5 – 195.0 | 99.5 |
| | | | 1.00 | 90.80 \pm 51.10 | 3.61 | 32.5 – 250.0 | 59.5 |
| | | | 3.00 | 93.08 \pm 37.11 | 2.62 | 35.0 – 157.5 | 69.0 |
| 29.00 | 163.05 \pm 23.78 | 1.68 | 105.0 – 200.0 | 100.0 | | | |

En la condición de medio sin suplemento los cometas generados en las esferas son de menor longitud que los de monocapa. Las esferas resisten el efecto de VP-16 a diferencia de monocapa que permanece siempre dañada sin lograr una disminución en el nivel de daño.

* El número de cometas evaluados fue de 200 para monocapa y esferas.

NaCl, exposición a solución isotónica. VP-16, exposición a etopósido. DE, desviación estándar. EE, error estándar.

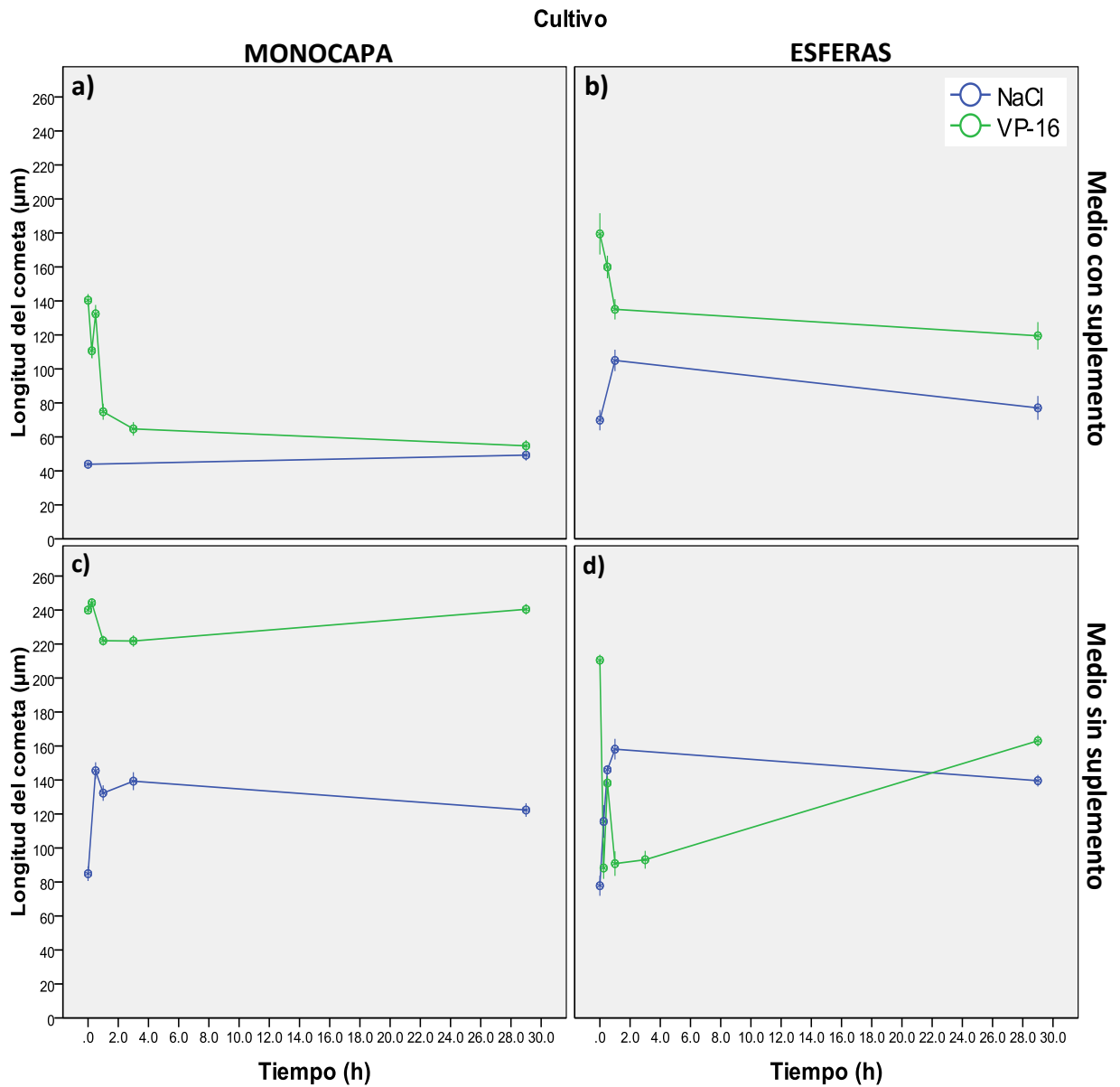


Figura 21. Comparando el daño causado en los cultivos es posible observar diferencias en las longitudes de los cometas. En condiciones de medio con suplemento las esferas tienen una mayor cantidad de daño con respecto a monocapa, incluso los cometas del control en las esferas son un poco mayores que en monocapa expuestas a VP-16. En condiciones de medio sin suplemento las longitudes de los cometas de monocapa expuesta al fármaco son mucho mayores que los cultivos de esferas, mientras que las longitudes entre las esferas expuestas y su control son similares, los cometas del control en monocapa son de tamaño similar a los generados en las esferas. Promedio \pm 2 EE

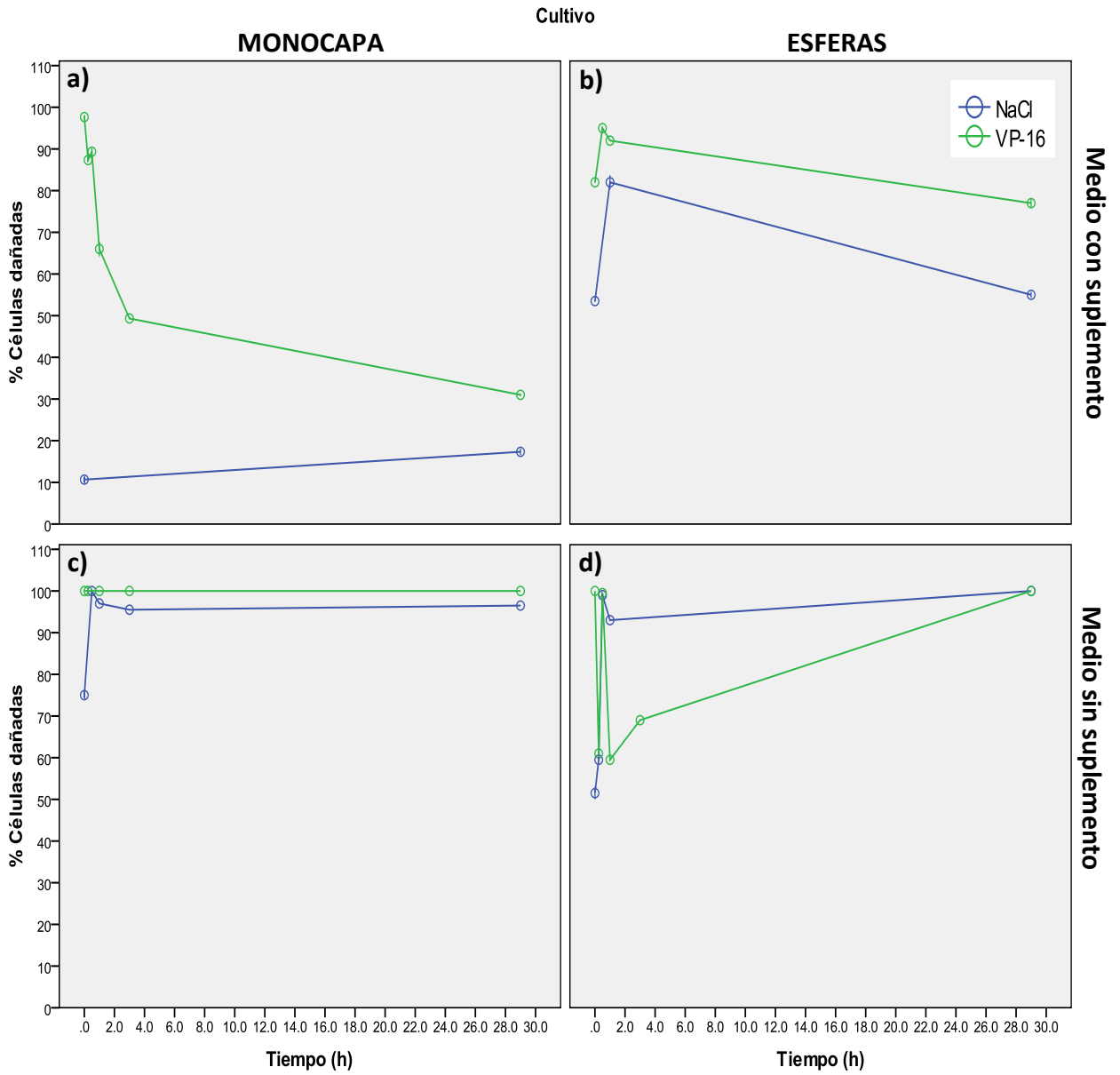


Figura 22. El porcentaje de células dañadas en las esferas tiende a ser menor después de la exposición a VP-16. Se muestran los porcentajes de células dañadas en cada punto evaluado, es evidente la recuperación en el cultivo de monocapa en medio con suplemento. A diferencia de los otros cultivos y condiciones, monocapa en medio sin suplemento permanece siempre dañada aún sin exponerla al fármaco, mientras que las esferas tienden a disminuir el porcentaje de células dañadas. Promedio \pm 2 EE

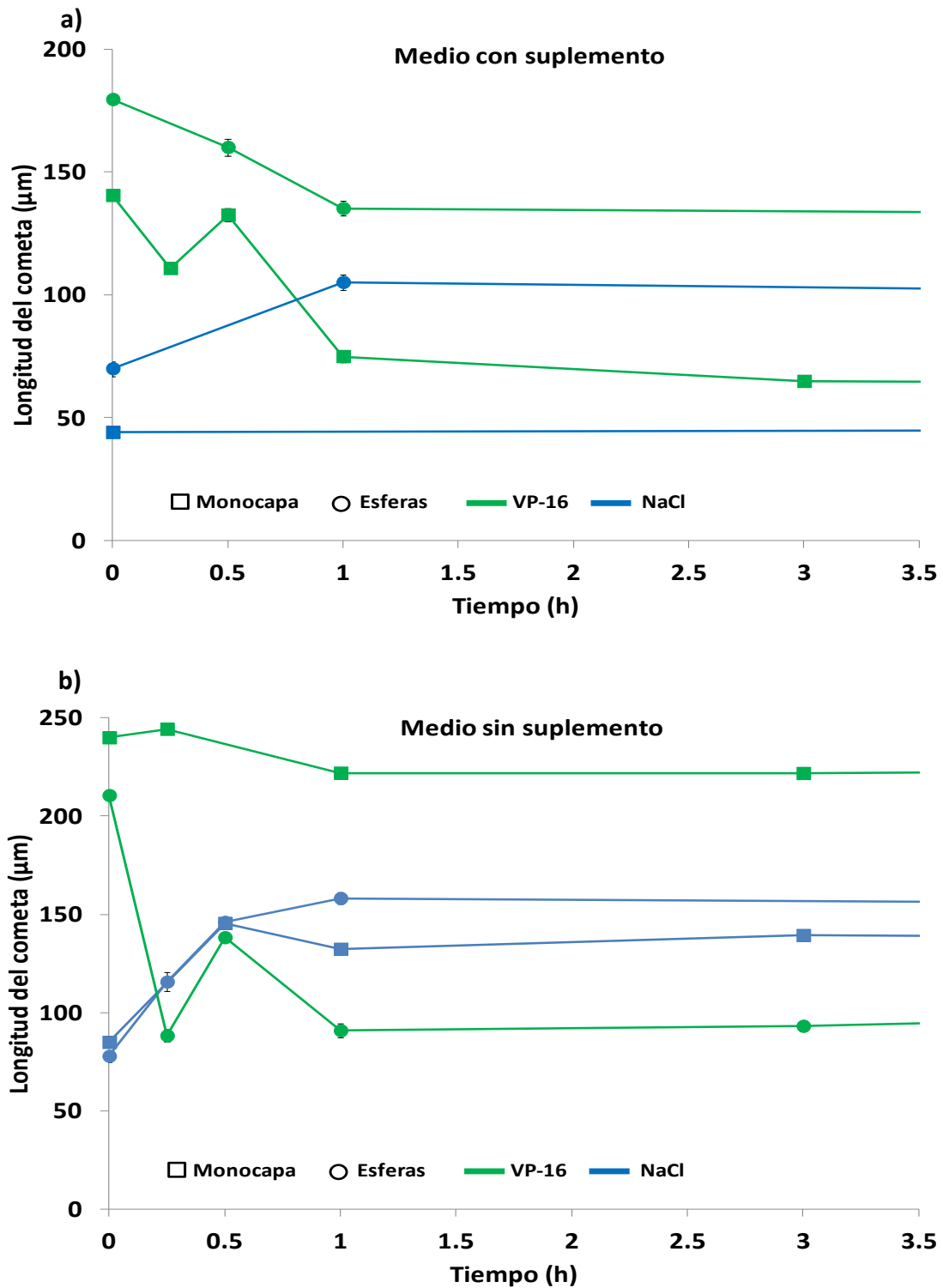


Figura 23. En las tres primeras horas de las cinéticas se observa el aumento o la reducción de la longitud de los cometas conforme el tiempo. a) En condiciones de medio con suplemento (MCS), monocapa reduce la longitud del cometa mejor que las esferas después de la exposición a VP-16. b) En condiciones de medio sin suplemento (MSS), monocapa permanece siempre dañada mientras que las esferas si reduce la longitud del cometa después de la exposición a VP-16, es poca la diferencia existente entre el control de monocapa y los cultivos en esferas. Promedio \pm 2 EE

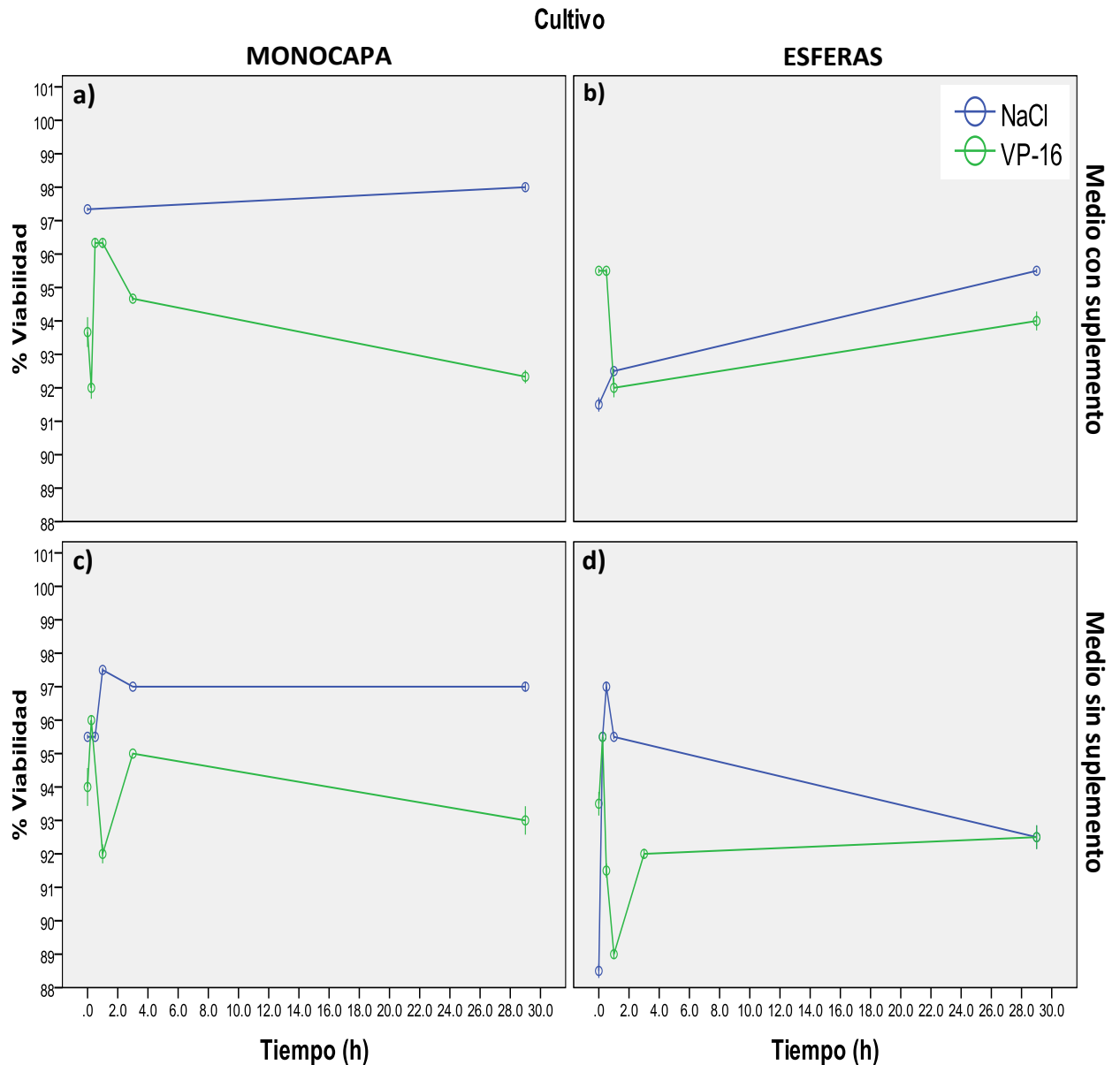


Figura 24. Viabilidad del cultivo antes del ensayo cometa. Para mostrar que el daño evidenciado no se debe a muerte celular, en cada tiempo también se determino la viabilidad del cultivo a la par que se inicia el ensayo cometa. Se empleo el método de exclusión del colorante azul de tripano. Se observa que la viabilidad en promedio siempre fue mayor al 90 % durante todos los puntos empleados en la cinética de reparación, lo que indica que la presencia de los cometas es realmente debido a la acción del fármaco y no por algún tipo de muerte celular. Promedio \pm 2 EE

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue comparar la habilidad de reparar daños en el ADN entre dos tipos de cultivos celulares de la línea celular HeLa, el cultivo heterogéneo en monocapa y el cultivo en esferas enriquecido en células troncales cancerosas. Dicha habilidad fue evaluada comparando la eficiencia de formación de colonias en agar o habilidad clonogénica, las cinéticas de reparación del ADN además de la identificación de marcadores de troncalidad.

El uso de etopósido (VP-16) como agente genotóxico se basa en su capacidad para inhibir a la Topoisomerasa tipo II estabilizando un complejo de ruptura, causando consecuentemente rupturas de cadena doble en el ADN³²⁻³⁴. Tiene buena respuesta sobre células epiteliales causando su muerte principalmente por la vía de apoptosis^{62,63}. En líneas celulares de cáncer cervicouterino VP-16 en combinación con otros fármacos y radiación tiene un óptimo desempeño, aunque de manera individual, los cultivos generan resistencia a ellos⁵¹. Previamente en el grupo de trabajo se ha observado que HeLa es sensible a VP-16 cultivándola en monocapa.

El crecimiento independiente de anclaje, aunque no exclusiva, es también una característica de las células con propiedades de células troncales cancerosas⁶⁻⁸ y mediante la formación de colonias en agar es posible evaluar la presencia de este tipo de células. Una cualidad de este ensayo es el crecimiento de células con habilidad proliferativa y clonogénica, las cuales dentro del modelo jerárquico de tumorigénesis son las células de troncales cancerosas o células iniciadoras de tumor¹⁶. Las células que sobrevivieron a la exposición del agente genotóxico generaron colonias en agar después de sucesivas divisiones mitóticas, lo cual

es resultado de una facultad o proceso biológico que las hace diferentes al resto de la población que fue eliminada.

El ensayo de formación de colonias en agar se ha empleado para la identificación de subpoblaciones celulares mayormente tumorigénicas que el resto de la población. En estos ensayos con medios de cultivo convencionales para la proliferación, poblaciones de líneas celulares de cáncer de mama que expresan marcadores de células troncales cancerosas ($CD44^+/CD24^{-/low}$ y $PROCR^+/ESA^+$) tienen mayor eficiencia de formación de colonias (EFC)²⁷. Diferentes subpoblaciones aisladas por distintos fenotipos de receptores CD en la línea celular B16-F10 de melanoma murino mostraron todas formación de de colonias, pero las caracterizadas como troncales cancerosas ($CD44^+CD133^+$) por ser mayormente tumorigénicas formaron colonias con mayor eficiencia que la población completa²⁵. La EFC encontrada en los cultivos empleados en este estudio manifiesta la presencia de células con la capacidad de crecimiento independiente de anclaje, elevada capacidad clonogénica y proliferación expansiva.

La población de la línea celular HeLa en monocapa contiene mayormente células diferenciadas y en menor proporción células menos diferenciadas o progenitoras, por ello es que solo 24 células de cada cien lograron generar colonias en agar. Cuando esta población heterogénea es expuesta al fármaco la EFC es abatida completamente debido a la sensibilidad del cultivo. En ambos casos, las células inoculadas son viables y no todas fueron capaces de generar la población de la colonia.

Al exponer los cultivos en esferas a las mismas condiciones que la monocapa, los resultados son diferentes. Con una EFC del 29%, las esferas que fueron expuestas a etopósido superan a las que no se expusieron que tienen una EFC del 16%, sin embargo no se supera la eficiencia de población en monocapa.

La formación de esferas ya es inicialmente un método de enriquecimiento en células poco diferenciadas o con características de troncales⁶⁻⁸, además de emplear el fármaco para eliminar células susceptibles a él, en el cultivo sobreviven prácticamente las que son resistentes y que tendrían el potencial de adquirir características de troncales, pues la farmacorresistencia es también una de sus propiedades^{29,64}. El aumento de la EFC en esferas expuestas a VP-16 podría deberse a una posible doble selección, es decir, las células que crecen en suspensión y además son dañadas por el fármaco solo sobreviven las que tienen mayor habilidad clonogénica.

El no encontrar diferencia en la EFC entre monocapa y esferas inicialmente hizo pensar en un efecto del medio de cultivo en el agar, las células en suspensión pasaron de medio *MammoCult* a DMEM cambiando las condiciones de crecimiento drásticamente. Por esta razón se decidió generar agares con *MammoCult* para conservar las condiciones de crecimiento, pero aún así el porcentaje de eficiencia no aumentó. Esto sugiere mejorar aún el procedimiento de enriquecimiento en células troncales cancerosas.

Un cambio que es muy evidente entre monocapa y esferas es la eficiencia de formación de colonias en agar de los cultivos expuestos al fármaco. HeLa monocapa que es sensible a VP-16 ya no lo es cuando crece en forma de esferas en suspensión. La respuesta fue tal que incluso tienen mayor eficiencia que las no expuestas, en condiciones de agar con *MammoCult* responden similar las expuestas y las no expuestas indicando que el fármaco no tiene efecto sobre las células en esferas.

Con la finalidad de conseguir cultivos en monocapa resistentes a etopósido se obtuvieron los etiquetados como VP-16 C y VP-16 2C. Al evaluar su eficiencia de formación de

colonias, VP-16 C presentó un mayor porcentaje que todos los cultivos, contrariamente VP-16 2C forma colonias con un porcentaje de eficiencia muy reducido.

La forma y el tamaño de las colonias formadas son también importantes en la evaluación de las mismas. En la literatura, las diferencias morfológicas de las colonias se han documentado, reportándose que colonias más grandes y uniformes son características de células con propiedades de células troncales cancerosas^{21,25,64}. Un alto número de colonias con mayor tamaño indican un aumento en la cantidad de células primitivas y por tanto una mayor tumorigenicidad del cultivo^{21,27}.

De los cultivos evaluados, las colonias con características similares a las anteriormente descritas son las originadas por esferas expuestas al fármaco, lo que indicaría que éstas son más tumorigénicas²⁷ que el resto de los cultivos. A diferencia del cultivo VP-16 C con mayor EFC, sus colonias son pequeñas y no homogéneas, dado que el fármaco causa arresto en el ciclo celular durante la transición G2/M⁶², las células podrían estar evadiendo este punto de control y proliferar extensivamente pero morir después de divisiones posteriores⁶³. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de un enriquecimiento en células con capacidad de iniciar un tumor expansivamente en estos cultivos en monocapa porque a con un mismo número de células inoculadas se obtiene una elevada cantidad de colonias en el agar. Esta cantidad no se obtiene de HeLa monocapa sin exposición y mucho menos del cultivo expuesto en una sola ocasión.

Las colonias generadas en agar fueron extraídas y al ser nuevamente expandidas en monocapa las células que integraban a la colonia proliferan con morfología diferente a la que caracteriza a HeLa. Después de algunos pasajes el cultivo prácticamente recupera su morfología y continúa con su expansión a pesar del potencialmente catastrófico daño causado por el fármaco en el ADN.

Para la evaluación del daño producido al ADN por etopósido se empleo el ensayo cometa en condiciones alcalinas⁵⁹ evaluando la presencia o ausencia de cometas, su longitud y la viabilidad de las células al iniciar el ensayo en cada punto a través del tiempo. El experimento está constituido por las variables tipo de cultivo y condición del cultivo. El diseño inicialmente estaba estructurado para solo comparar la cinética de reparación entre monocapa y esferas, pero los datos resultaban ser inconsistentes, por lo que se consideró también evaluar la presencia o ausencia del suplemento en el medio de cultivo según corresponde a cada uno (monocapa o esferas) durante la exposición a VP-16. Una serie de cinéticas de reparación fueron construidas para su comparación. Durante la estandarización del método, como control positivo se utilizaron cultivos de HeLa en monocapa expuestos a luz UV por 15 minutos para comprobar que el sistema funciona (los datos no se muestran), como control negativo se empleó HeLa en monocapa expuestos a solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl).

Analizando el primer par de cinéticas, el cultivo en monocapa en presencia del suplemento en el medio durante la exposición al fármaco y su respectivo control, al tiempo cero después de retirar el fármaco, la monocapa presenta cometas con una longitud promedio de 140 μm , que comparado con el control son significativamente diferentes. Con forme se permite la recuperación del cultivo, la longitud promedio de los cometas disminuye hasta 54 μm así como el número de células dañadas, en el control al tiempo cero y a las 29 horas la longitud de los cometas permanece constante. Los tiempos de cero y 29 horas del cultivo expuesto al fármaco son diferentes, mientras que el tiempo de 29 horas en ambas condiciones es similar indicando que el cultivo en monocapa con suero durante la exposición al fármaco logra recuperarse del daño al ADN.

El cultivo en esferas con presencia del suplemento en el medio durante la exposición al fármaco, la longitud promedio de los cometas en general es mayor que si su contraparte monocapa, el control también muestra daños. Aunque hay una disminución gradual del daño en el cultivo expuesto a VP-16, la recuperación no logra alcanzar la condición del control a las 29 horas, los cultivos de esferas presentan mayor daño. Observando las primeras tres horas en la gráfica se puede notar que existe disminución del daño generado por el fármaco en el cultivo heterogéneo y menos eficiente en las esferas. Esta fue la situación donde los datos fueron fortuitos ya que, teóricamente, el cultivo enriquecido en células troncales debe ser más resistente al efecto de los fármacos²⁹.

Etopósido es un compuesto con una elevada afinidad por proteínas plasmáticas³⁶ por lo que la ausencia del suero fetal bovino en el medio aumenta su acción sobre las células, lo que explica el daño elevado y constante. Aunque existe una disminución en el número de células dañadas y el nivel de lesiones disminuye, al final su habilidad clonogénica se ve afectada y no sobreviven. Caso contrario ocurre en los cultivos de esferas, la composición del suplemento es diferente y su privación también causa un aumento en el nivel de daño, sin embargo en estos cultivos si disminuye la longitud de los cometas además de conservar su habilidad clonogénica.

Se observa una mejor respuesta al daño en las esferas expuesto al fármaco siendo similar e incluso menor que la del control. Visualizando las tres primeras horas de las cinéticas se nota que el promedio de los cometas de los cultivos de esferas se traslapan, mientras que la monocapa expuesta a VP-16 se encuentra mayormente dañada. La viabilidad por exclusión del azul de tripano en cada punto de las gráficas es mayor al 90 % indicando que los daños en el ADN no son consecuencia de la presencia de células ya en estado de muerte.

El daño causado por etopósido en el ADN fue rupturas de cadena doble, los mecanismos implicados para la reparación de este tipo de daño son la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), ambas vías son activas de acuerdo a la fase del ciclo celular en el que se encuentre la célula. HR actúa principalmente durante las fases S y G2 del ciclo, para el proceso se requiere una secuencia de ADN que es empleada como molde para la reparación, mientras que NHEJ es activa a lo largo del ciclo y no es necesario un molde para corregir el daño⁵³. En el grupo de trabajo, caracterizando cultivos enriquecidos por esferas de HeLa, se ha encontrado mediante perfiles de expresión, un aumento en los componentes de la maquinaria de reparación de rupturas de cadena doble NHEJ y HR⁸.

La sobrevivencia celular posterior a los daños causados por etopósido manifiesta una posible mayor actividad de los mecanismos de reparación. En una comparación del nivel de actividad de las vías de reparación entre células embrionarias con características troncales y células diferenciadas, en las primeras el mecanismo por escisión de nucleótidos a nivel global es más eficiente⁶⁵.

La expresión de los marcadores *Oct-4* y *Nanog* ha sido reportada en cáncer de mama⁶⁶, en poblaciones de cáncer pulmonar con propiedades de troncales⁶⁷ así como en cultivos de HeLa quimioresistentes^{18,68}. En los cultivos evaluados no se encontró *Oct-4* ni diferencia en la expresión de *Nanog* indicando que estos no podrían ser adecuados marcadores para células troncales de cáncer cervicouterino.

La evidencia con que se cuenta para mostrar el enriquecimiento en células troncales en los cultivos evaluados radica en la caracterización que se continúa en el grupo de trabajo. Los cultivos han mostrado ser más tumorigénicas que monocapa al generar tumor en ratón inmunodeficiente con hasta 1×10^4 células, así como la presencia del marcador de superficie CD49f en un elevado porcentaje, marcador candidato para células troncales de cáncer cervicouterino⁸.

IX. CONCLUSIONES

- Los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas por formación de esferas resistentes tienen mejor respuesta al daño en el ADN causado por el fármaco etopósido que los cultivos heterogéneos en monocapa.
- Los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas por formación de esferas que sobreviven a los daños causados por el fármaco etopósido presentan una mayor tumorigenicidad *in vitro* que los cultivos heterogéneos en monocapa.
- La ausencia del suplemento en los medios de cultivo tiene un efecto sobre el ADN y sobre la respuesta al daño, en monocapa el fármaco daña más a las células disminuyendo la capacidad de formar colonias en agar.
- En cultivos de esferas con o sin suplemento del medio, el fármaco también daña a las células en el ADN pero no reduce la capacidad de formar colonias en agar a pesar de los daños en el ADN.

X. PERSPECTIVAS

- Mejorar el método de enriquecimiento de células troncales por formación de esferas.
- Confirmar la reparación del ADN a un intervalo de tiempo mayor en los cultivos que sobreviven a la exposición al fármaco etopósido.
- Indagar la vía de reparación activa en los cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas.
- Establecer las diferencias en la(s) vía(s) de respuesta a daño al ADN entre los cultivos heterogéneos y los enriquecidos en células troncales cancerosas así como en otros procesos involucrados con la sobrevivencia a efectos genotóxicos.
- Realizar una evaluación de estos procesos en muestras provenientes de tumores de cáncer cervicouterino.

XI. REFERENCIAS

1. Cancer of the cervix. Sexual and reproductive health. Programmes and projects. WHO 2012. En línea: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en/index.html>
2. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer 2011. INEGI 2012, En Línea: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>
3. Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat Rev* 2008; 34 (7): 603 – 13
4. Ishii H, Iwatsuki M, Ieta K, Ohta D, Haraguchi N, Mimori K, Mori M. Cancer stem cells and chemoradiation resistance. *Cancer Sci* 2008; 99 (10) 1871 – 77
5. Dalerba P, Cho RW, Clark MF. Cancer stem cells: Model and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58: 267 – 84
6. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, Alison MR, Miotti S. Development and critical characterization of model derived from A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle* 2010; 9 (6): 1194 – 1206
7. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports* 2009; 22: 1129 – 34
8. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 2012; 12 (48)
9. Anzaldúa SR, Juárez ML, Villaseñor H, Ríos MC, Cornejo MA, Meraz MA. ¿Qué son las células troncales o células madre? *Vet Mex* 2007; 38: 81 – 104
10. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675 – 99
11. Seufferlein T, Ahn J, Krndija D, Lothar U, Adler G, von Wichert G. Tumor biology and cancer therapy - an evolving relationship. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 19
12. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (12): 895 – 902
13. Vaish M. Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cell and therapeutic implications. *Mol Cancer* 2007; 6: 26
14. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer Stem Cell – Perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2006; 66 (19): 9339 – 44
15. Reya T, Morrison SJ, Clark MF. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105 – 11
16. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112 (13): 4793 – 4807
17. Darini CY, Pisani DF, Hofman P, Pedoutour P, Sudaka I, Chomienne C, Dani C, Ladoux A. Self-renewal gene tracking to identify tumor-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene* 2011: 1 – 12
18. Wang XQ, Ongkeki WM, Che L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-Binding cassette G2 pathway. *Hepatology* 2010
19. Klemm JD, Pabo CO. Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes Dev* 1996; 10: 27 – 36
20. Chen L, Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* 2008; 17: R23–27
21. Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells* 2008; 26: 988 – 96
22. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65: 5506 – 11
23. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3025 – 9
24. Peehl DM, Stanbridge EJ. Anchoraje-independent growth of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 (5): 3053 – 57
25. Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. Isolation and identification of cancer stem – like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol* 2007; 4 (6): 467 – 72

26. Bennett RD, Mauer AS, Strehler EE. Calmodulin – like Protein increases filopodia – dependent cell motility via Up – regulation of Myosin – 10. J Biol Chem 2007; 282 (5): 3205 – 12
27. Hwang–Verslues WW, Kuo WH, Chang PO, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling whit stem cell markers. PLoS ONE 2009; 4: e8337
28. de Castro C. Ensayo de formación de colonias para determinar el efecto de extracto, fracciones o sustancias sobre ciclo celular. Facultad de Medicina, Colombia 2007. Disponible en: old.ivpac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-3.pdf 24 Agosto 2010, 10:18 hs
29. Maugeri-Sacca M, Vigneri P, De Maria R. Cancer stem cells and chemosensitivity. Clin Cancer Res 2011; 17 (15): 4942 – 47
30. Lizano M, Barrera R. Resistencia multiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. Rev Invest Clin 1993; 45: 481 – 92
31. Targeting cancer at its root; developing novel drugs that attack cancer stem cells. Stemline therapeutics, Inc. En línea: www.stemline.com/csc.asp www.stemline.com/images/cscLarge.gif Abril 2011
32. Wilstermann AM, Osheroff N. Stabilization of eukaryotic Topoisomerase II-DNA cleavage complexes. Curr Top Med Chem 2003; 3 (3): 321 – 38
33. Meresse P, Dechaux E, Monneret C, Bertounesque E. Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry. Curr Med Chem 2004; 11 (18):2443-66
34. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5 (4): 363 – 72
35. PubChem Compound. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> 24 Agosto 2010 12:00hs
36. Nichols CR. The role of etoposide therapy in germ cell cancer. Semin Oncol 1992; 19 (6 Suppl 13): 72 – 7
37. Loehrer PJ Sr. Etoposide therapy for testicular cancer. Cancer 1991; 67 (1 Suppl): 220 – 4
38. Motzer RJ, Sheinfeld J, Mazumdar M, Bajorin DF, Bosl GJ, Herr H, Lyn P, Vlamis V. Etoposide and cisplatin adjuvant therapy for patients with pathologic stage II germ cell tumors. J Clin Oncol 1995; 13 (11): 2700 – 4
39. Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. Treatment of Disseminated Germ-Cell Tumors with Cisplatin, Bleomycin, and either Vinblastine or Etoposide NEngl J Med 1987; 316:1435 – 40
40. Hainsworth JD, Greco FA. Etoposide: twenty years later. Ann Oncol 1995; 6 (4): 325 – 41
41. Johnson DH, Hainsworth JD, Hande R, Greco FA. Current status of etoposide in the management of small cell lung cancer. Cancer 1991; 67 (1 Suppl): 231 – 44
42. Hong WK, Nicaise C, Lawson R, Maroun JA, Comis R, Speer J, Luedke D, Hurtubise M, Lanzotti V, Goodlow J, et al. Etoposide combined with cyclophosphamide plus vincristine compared with doxorubicin plus cyclophosphamide plus vincristine and with high-dose cyclophosphamide plus vincristine in the treatment of small-cell carcinoma of the lung: a randomized trial of the Bristol Lung Cancer Study Group. J Clin Oncol 1989; 7 (4): 450 – 6
43. Turrisi AT, Glover DJ, Mason BA. Concurrent twice-daily radiotherapy plus platinum-etoposide chemotherapy for the treatment of limited small cell lung cancer: a preliminary report. Antibiot Chemother 1988; 41: 109 – 14
44. Aisner J, Lee EJ. Etoposide. Current and future status. Cancer 1991; 67: (1 Suppl): 215 – 9
45. Henwood JM, Brogden RN. Etoposide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. Drugs 1990; 39 (3):438-90
46. Bishop JF. Etoposide in the treatment of leukemias. Semi Onco 1992; 19 (6 Suppl 13): 33 – 8
47. Schwartzmann G, Sprinz E, Kronfeld M, Vinholes J, Sander E, Zampese M, Preger R, Kalakun L, Brunetto AL. Phase II study of teniposide in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. Eur J Cancer 1991; 27 (12): 1637 – 9
48. Ruckdeschel JC. Etoposide in the management of non-small cell lung cancer. Cancer 1991; 67: 250 – 53
49. Nichols CR. Role of etoposide in treatment of breast cáncer. Semin Oncol 1992; 19 (Suppl 13): 67 – 71
50. Sledge GW. Etoposide in the management of metastatic breast cáncer. Cancer 1991; 67: 266 – 70
51. Tanaka T, Bai T, Yukawa K, Umesaki N. Optimal combination chemotherapy and chemoradiotherapy with etoposide for advanced cervical squamous cancer cells *in vitro*. Oncol Rep 2006; 15 (4): 939 – 47
52. Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons. 7^a ed. USA: McGraw-Hill; 2008
53. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kacmaz K, Stuart Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 2004; 73:39–85

54. Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Letters* 2007; 7 (12): 3592 – 97
55. Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Research* 2007; 35 (22): 7557 – 65
56. Vinoth KJ, Heng BC, Poonepalli A, Banerjee B, Balakrishnan L, Lu K, Hande MP, Cao T. Human Embryonic Stem Cells May Display Higher Resistance to Genotoxic Stress As Compared to Primary Explanted Somatic Cells. *Stem Cells Devel* 2008; 17:599–607
57. Lane AA, Scadden DT. Stem Cells and DNA Damage: Persist or Perish? *Cell* 2010; 142: 360 – 62
58. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000; 15 (4): 298 – 302
59. Singh NP, Stephens RE. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms and DNA electrostretching. *Muta Res* 1997; 383: 167 – 75
60. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M,, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23 (3): 143 – 51
61. Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 2008; 23 (3): 171 – 82
62. Nam C, Doi K, Nakayama H. Etoposide induce G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histol Histopathol* 2010; 25: 485 – 93
63. El-Awady RA, Ali MM, Saleh EM, Ghaleb FM. Apoptosis is the most efficient death-pathway in tumor cells after topoisomerase II inhibition. *Saudi Med J* 2008; 29 (4): 558 – 64
64. Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, *et al.* Spheres-forming cell subpopulation with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterology* 2011; 11:71
65. Luo LZ, Gopalakrishna-Pillai S, Nay SL, Park SW, Bates SE, *et al.* DNA repair in human pluripotent stem cell is distinct from that in no-pluripotent human cells. *PLoS One* 2012, 7 (3): e30541
66. Ezeh U, Turek P, Reijo R, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 2255 – 65
67. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e2637
68. Ruíz-Ramírez G. Evaluación de la presencia de células troncales cancerosas en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la identificación de marcadores de troncalidad. Tesis de grado, CIVESTAV-IPN: México, 2011