



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la vía WNT dependiente de β -catenina en cultivos derivados de las líneas celulares HeLa y SiHa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Miguel Angel Sarabia Sánchez

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez
[Facultad de Medicina](#)

Dr. Jesús Chimal Monroy
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Agosto, 2018



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.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez

y el Dr. Alejandro García Carrancá en el laboratorio de Virus y Cáncer,

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer,

Instituto de Investigaciones Biomédicas,

Universidad Nacional Autónoma de México

& División de Investigación Básica,

Instituto Nacional de Cancerología.

RECONOCIMIENTOS

Se reconoce la asesoría académica del comité tutorial integrado por:

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez	Facultad de Medicina
Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular

Se reconoce la asesoría técnica de los encargados de las unidades de trabajo:

Q.F.B. Carlos Castellanos Barba	Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Miguel Tapia Rodríguez	Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas

El presente trabajo se realizó gracias a la beca para estudios de maestría otorgada por CONACyT, dentro del programa “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México. Nombre del becario: Sarabia Sanchez Miguel Angel, CVU: 550337.

Se reconoce el apoyo de los proyectos:

- Relevancia de la vía de Wnt en las células troncales de cáncer cérvico-uterino, apoyado por SEP/CONACYT 179894.
- Ciencia Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 253804) y la Fundación Miguel Alemán, A.C.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos deberían de ser lo más sencillo de escribir, pero justo ahora no estoy tan seguro de ello. Es difícil poder mencionar a todas las personas y además hacerlo en frases que siempre se quedarán cortas, pero es obligación reconocer todos los esfuerzos individuales de aquellas personas que me rodearon a lo largo de este camino.

En primer lugar agradecer a Dios, por haberme dado la oportunidad de disfrutar de este trabajo, que si bien fue más largo de lo calculado, agradezco los buenos y malos momentos *“...anuncia lo pasado y lo futuro, y descubre las huellas de las cosas secretas”*.

A mi papá y a mi mamá, que con su amor incondicional me impulsan cada día a continuar hacia adelante, a mejorar y a ser feliz. Confío que disfrutarán de este logro, que es solo un poco de correspondencia a todo lo que me han dado y que me hace sentir inmensamente en deuda con ustedes, los amo.

A Marce, con quien comparto mucho del esfuerzo y sacrificio de este trabajo. Le agradezco que esta etapa no solo fuera de crecimiento académico, sino como ser humano de manera integral. Por ser mi motivación y apoyo al mismo tiempo, te amo.

A la Dra. Eli, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto, aún en los momentos con menor clarividencia, por respetar mi personalidad, por la paciencia, por el esmero de que el trabajo y yo saliéramos adelante, y por darme ánimos de inicio a fin para acabar este ciclo y comenzar el siguiente.

Al Dr. Carrancá por fungir como tutor principal, por permitirme estar en su laboratorio, por el interés en el avance del trabajo y por sus aportaciones intelectuales, además de su buen humor.

A mis compañeros, colegas y amigos en cada una de las etapas del desarrollo de este trabajo que hicieron que la rutina de ir al laboratorio se volviera un regalo cada día.

A Mau y Leny que estuvieron ahí en el inicio y que hicieron que la transición a un nuevo laboratorio fuera mucho más enriquecedora, agradezco su amistad y la convivencia con ustedes dentro y fuera del INCan.

A Heri, que siempre ha sido un enorme apoyo para mi crecimiento personal, académico y deportivo, por su disponibilidad todo el tiempo para ayudar y enseñar, por su camaradería y su buena voluntad.

A Luz y Lalo, con quienes la afinidad de personalidades me ha llevado a seguir disfrutando la última etapa.

A Mariel, Carlitos, Karen y Helga que hacían del ambiente en el INCan más divertido y alegre ya fuese desde esperar la incubación de un experimento hasta esperar para entrar al comedor.

A Miriam por su disposición, apoyo y asesoría técnica a lo largo de este trabajo.

A los que estuvieron desde unas semanas hasta unos años en el laboratorio, por compartir tiempo y lugar conmigo: a Vero Beatriz, Vero Vejar, Pedro, Vincent, Ale, Grace, Iván, Angel, Itzel, Andrei, Yake, Silvia, Brenda, Francisco, Marisol, Lissania, Marco y a todos los que no menciono pero que estuvieron ahí, en el día a día.

A mis amigos de ciencia y futbol, que desde hace años me han servido de ejemplo para superarme académicamente, a Hugo, mi tocayo Miguel, Paco, Blad, Isaac, Martín, Cristian, Pancho, Gabriele, además de no olvidar a los que ya no veo: a Daniel (men) y Daniel (costeño).

A mis compañeros y amigos fuera del laboratorio, que aunque pareciera no evidente, también son parte del presente trabajo. A cada uno de ustedes, gracias.



EN MEMORIA DE
SELIK ARTURO CAMACHO AGUILAR
Y DE CADA FAMILIAR, AMIGO Y COMPAÑERO FALLECIDO EN LA LUCHA CONTRA EL
CÁNCER

“...la dificultad aumenta la conciencia de nuestro reconocimiento”

ÍNDICE

1	RESUMEN	8
1.1	Abstract	9
2.	INTRODUCCIÓN	10
2.1	¿Qué es el cáncer?	10
2.2	Heterogeneidad en el cáncer	10
2.3	¿Cómo explicar la heterogeneidad en el cáncer?	12
2.3.1	Modelo de Evolución Clonal	12
2.3.2	Modelo Jerárquico	14
2.3.3	Modelo de Plasticidad	15
2.4	Células Troncales Cancerosas (CTC)	17
2.4.1	La capacidad de auto-renovación	17
2.4.2	El potencial tumorigénico	18
2.4.3	La diferenciación en células no tumorigénicas	19
2.4.4	La expresión de marcadores celulares	19
2.4.5	Restricción a una minoría de la población total del tumor	20
2.5	Actividad de ALDH como marcador celular de las CTC	20
2.6	Cultivo de esferas para enriquecimiento de las CTC	22
2.7	Vías de señalización detrás de las CTC	23
2.7.1	Vía WNT	24
2.7.1.1	Vía WNT canónica o dependiente de β -catenina	25
2.7.1.2	Alteraciones de la vía WNT/ β -catenina en el cáncer	27
2.8	¿Por qué el Cáncer Cérvico-Uterino?	28
2.8.1	Las CTC en el Cáncer Cérvico-Uterino	30
2.8.2	Alteraciones de la vía WNT/ β -catenina en el Cáncer Cérvico-Uterino	31
3	HIPÓTESIS	34
4	OBJETIVO GENERAL	34
4.1	Objetivos específicos	34
5	DISEÑO EXPERIMENTAL	35
6	MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1	Cultivo celular	36
6.1.1	Cultivo celular en monocapa	36
6.1.1.2	Activación o inhibición de la vía WNT/ β -catenina	36
6.1.2	Cultivo celular de esferas	36
6.2	Citometría de Flujo	37
6.2.1	Marcaje de proteínas	37
6.2.2	Medición de la actividad de ALDH	37

6.3	Separación y extracción de proteínas en fracciones nucleares y fracciones citoplasmáticas/membranales	37
6.4	Western Blot	38
6.5	Inmunofluorescencia	39
6.6	Viabilidad celular y citotoxicidad	39
6.6.1	Ensayo de MTT	39
6.6.2	Tinción por Azul de Tripano	39
6.7	Análisis estadístico	40
7	RESULTADOS	40
7.1	Caracterización de la vía WNT/β-catenina en cultivos en monocapa de células HeLa y SiHa	40
7.2	Las células HeLa y SiHa expresan proteínas transmembranales relacionadas a la vía WNT/β-catenina	45
7.3	Comparación en la vía WNT/β-catenina de cultivos en monocapa con cultivos de esferas de células HeLa y SiHa	51
7.4	Efecto de la activación o inhibición de la vía WNT/β-catenina en el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en cultivos de monocapa y esferas de HeLa y SiHa	58
8	DISCUSIÓN	68
8.1	HeLa vs SiHa	73
9	CONCLUSIONES	76
10	PERSPECTIVAS	76
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Heterogeneidad tumoral.....	12
FIGURA 2. Modelos para la heterogeneidad tumoral.....	17
FIGURA 3. Esquema de la vía WNT dependiente de β -catenina.....	27
FIGURA 4. Diseño experimental.....	35
FIGURA 5. Las células HeLa y SiHa son β -catenina ⁺ en cultivos en monocapa.....	40
FIGURA 6. β -catenina se localiza en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células HeLa y SiHa en cultivos en monocapa.....	42
FIGURA 7. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) se localiza en la fracciones citoplasmática/membranal y nuclear de células HeLa y SiHa en cultivos en monocapa.....	43
FIGURA 8. Las células HeLa y SiHa son ABC ⁺ en cultivos en monocapa.....	44
FIGURA 9. Las células HeLa y SiHa son C-MYC ⁺ en cultivos en monocapa.....	45
FIGURA 10. Subpoblación celular FZD ⁺ /LGR5 ⁺ en los cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	46
FIGURA 11. Una subpoblación celular FZD ⁺ es LGR5 ⁺ y una subpoblación celular LGR5 ⁺ es FZD ⁺ en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	48
FIGURA 12. Subpoblación celular FZD7 ⁺ /LRP6 ⁺ en los cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	49
FIGURA 13. Una subpoblación celular FZD7 ⁺ es LRP6 ⁺ y una subpoblación celular LRP6 ⁺ es FZD7 ⁺ en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	50
FIGURA 14. Las células ALDH ^{ALTO} y FZD ⁺ incrementan su porcentaje en cultivos de esferas de HeLa y SiHa.....	52
FIGURA 15. Las células ALDH ^{ALTO} y las células FZD ⁺ son subpoblaciones independientes en HeLa y SiHa.....	54
FIGURA 16. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) disminuyen en cultivos de esferas de HeLa y SiHa.....	55
FIGURA 17. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) disminuyen en la fracción citoplasmática/membranal en cultivos de esferas de HeLa y SiHa.....	56
FIGURA 18. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en la fracción nuclear en esferas incrementan en HeLa y disminuyen en SiHa.....	57
FIGURA 19. Mecanismos de acción de las moléculas GSK3-IX y ENDO-IWR en la vía WNT/ β -catenina.....	59
FIGURA 20. GSK3-IX o ENDO-IWR no afectan la viabilidad de las células HeLa y SiHa a las 48 h en cultivos en monocapa.....	60
FIGURA 21. GSK3-IX incrementa los niveles de β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	61
FIGURA 22. ENDO-IWR disminuye los niveles de β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en cultivos en monocapa de SiHa, pero no de HeLa.....	62
FIGURA 23. GSK3-IX o ENDO-IWR relocalizan intracelularmente a β -catenina en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa.....	63
FIGURA 24. GSK-3IX disminuye el porcentaje de células ALDH ^{ALTO} en cultivos en monocapa de HeLa, mientras que lo incrementa en SiHa.....	64
FIGURA 25. ENDO-IWR incrementa el porcentaje de células ALDH ^{ALTO} en cultivos en monocapa de HeLa, pero lo disminuye en SiHa.....	65
FIGURA 26. El pre-tratamiento de GSK3-IX disminuye el porcentaje de células ALDH ^{ALTO} en esferas de HeLa, mientras que lo aumenta en SiHa.....	66

FIGURA 27. El pre-tratamiento de ENDO-IWR decrementa el porcentaje de células ALDH ^{ALTO} en esferas de HeLa, pero lo aumenta en SiHa.....	67
FIGURA 28. GSK3-IX disminuye la forma fosforilada de Y279/216 de GSK3 α/β más en HeLa que en SiHa.....	68
TABLA I Comparación entre HeLa y SiHa.....	75

Abreviatura Significado

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDH ^{ALTO}	Alta actividad de ALDH
ALDH ^{BAJO}	Baja actividad de ALDH
ABC	β -catenina no fosforilada en S37 y T41
ABCG2	Transportador con casete de unión a ATP G2
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Poliposis coli adenomatosa
BAA	BODIPY-aminoacetato
BAAA	BODIPY-aminoacetaldehído
BCL9	Proteína de células B de linfoma 9
BCL9L	Proteína similar a BCL9
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblasto básico
BMI1	Proteína del complejo Polycomb 1
BRG1	Proteína codificada por el gen relacionado a Brahma 1
BSA	Albúmina de suero bovino
Cacu	Cáncer Cérvico-Uterino
CBP	Proteína de unión a CREB
CD	Moléculas del grupo de diferenciación
c-FLIP-L	Inhibidor celular proteínico largo de FLICE
CKI α	Cinasa de caseína 1 alfa
CK17	Citoqueratina 17
CK2	Cinasa de caseína 2
CIS	Carcinoma cervical in situ
CND1	Subunidad del complejo de Condensina 1
CtBP	Proteína de unión al extremo carboxilo terminal
CTC	Célula troncal cancerosa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DEAB	N,N-dietilaminobenzaldehído
DIX	Dominio asociado a DSH y AXINA
DKK1	Proteína relacionada a Dickkopf 1
DSH	Proteína Dishevelled
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición de epitelio a mesénquima
ENG	Proteína endoglina
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FGF	Factor de crecimiento de fibroblasto
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FOXM1	Proteína con caja "forkhead" M1
FZD	Proteína Frizzled
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GBP	Proteína de unión a GSK3 β
GSK3 β	Cinasa de sintasa de glicógeno 3 beta
HDAC	Histona deacetilasa

Abreviatura Significado

HeLa	Acrónimo de Henrietta Lacks
ICAT	Proteína inhibidora de β -catenina y TCF4
IP	Yoduro de propidio
ITGB1	Precursor de integrina beta 1
JAG1	Proteína “ <i>Jagged</i> ” 1
JAK	Cinasa Janus
JNK	Cinasa del amino terminal de c-JUN
LCR	Región de control largo
LEF	Factor proteínico potenciador linfoide
LGR5	Receptor acoplado a proteína G con repeticiones ricas en leucina 5
LRP	Proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad
MAP	Proteína activa por mitógeno
MEK	Cinasa de MAPK/ERK
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MZF1	Proteína con dedos de Zinc mieloide 1
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NKX2-1	Proteína con homeocaja NK2-1
NLK	Cinasa tipo Nemo
NOD/SCID	Cepa con inmunodeficiencia combinada severa y diabética no severa
NT5E	Precursor de nucleotidasa 5
OCT4	Factor de transcripción de unión en octámero 4
p300	Acetiltransferasa de histona
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PCGF4	Proteína con motivos de dedo RING del grupo de Polycomb 4
PCP	Polaridad de célula plana
PI3K	Cinasa de fosfatidilinositol-3
PITX2	Factor de transcripción con homeodominio tipo “ <i>Paired</i> ” 2
PKA	Proteína cinasa A
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PSCA	Antígeno de célula troncal de próstata
PYGO	Proteína miembro de la familia Pygopus
RGS	Dominio regulador de la señalización por proteína G
rpm	Revoluciones por minuto
SCC	Carcinoma de células escamosas
SFB	Suero fetal bovino
SFRP	Proteína secretada relacionada con Frizzled
SIAH1	Proteína siete en ausencia homólogo 1
SIL	Lesión intraepitelial escamosa
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SMAD	Acrónimo de Mad y Sma
SOX2	Factor de transcripción con cajas SRY 2
SSC	Luz por dispersión lateral
STAT	Proteína transdutora de señal y activadora de la transcripción
SWI/SNF	Complejo remodelador del nucleosoma de levadura
TCF	Factor proteínico de célula T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIC	Célula iniciadora de tumor

Abreviatura Significado

β -TrcP	Ligasa de ubiquitina E3 con repeticiones de transducina beta
URF	Unidades relativas de fluorescencia
URI	Unidades relativas de intensidad
VPH	Virus del papiloma humano
WDR26	Proteína con repeticiones WD 26
WIF1	Factor proteínico inhibitorio de WNT1
WNT	Glicoproteína que funciona como ligando extracelular

1. RESUMEN

El cáncer se caracteriza por una heterogeneidad celular tanto inter-tumoral como intra-tumoral. Esta heterogeneidad representa un reto en el campo clínico, por lo que se han propuesto modelos que permitan explicarlo. Dentro de estos, el Modelo de Plasticidad es el más reciente y es el que más se aproxima a lo descrito en el cáncer. En este modelo se propone que las Células Troncales Cancerosas (CTC) constituyen la base de esta heterogeneidad, además de ser claves para iniciar y mantener el crecimiento tumoral. Es por esto que, muchos estudios se han enfocado en estudiar a las CTC en diferentes tipos de cáncer, como en el Cáncer Cérvico-Uterino (Cacu).

Una de las características de las CTC es la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina, la cual se ha asociado al cáncer y ahora se propone importante para las CTC. En el Cacu se ha descrito una desregulación en la vía WNT/ β -catenina, pero su participación en las CTC aún no se ha definido. Esto se debe en parte a que, uno de los desafíos al estudiar a las CTC es que en la mayoría de los casos, representan un porcentaje bajo en comparación al total de células dentro de un tumor. Es por ello que para enriquecer a las CTC *in vitro*, el cultivo de esferas ha sido una herramienta útil, que en combinación con el uso de la enzima Aldehído Deshidrogenasa (ALDH), en particular su alta actividad (ALDH^{ALTO}) como marcador celular de las CTC, ofrecen la oportunidad de evaluar la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC en el Cacu.

Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis fue evaluar la vía WNT/ β -catenina en HeLa y SiHa, dos líneas celulares provenientes de Cacu, tanto en cultivos de monocapa como en cultivos de esferas. Además se analizaron los porcentajes de CTC, referidos como células ALDH^{ALTO}, tras activar o inhibir la vía de WNT/ β -catenina.

Los resultados mostraron que los componentes de la vía WNT/ β -catenina están presentes tanto en células HeLa como en SiHa, además de presentar una activación basal en cultivos en monocapa. Sin embargo, en los cultivos de esferas esta activación incrementó en HeLa mientras que disminuyó en SiHa, sugiriendo que la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC depende de la línea celular en estudio. Bajo la misma idea, al activar la vía WNT/ β -catenina, disminuyó el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en HeLa, mientras que aumentó en SiHa en cultivos en monocapa. De manera opuesta, al inhibir ésta vía, aumentó y disminuyó el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en HeLa y SiHa, respectivamente. Estos resultados señalan que, a pesar de que las células HeLa y SiHa provienen de un mismo tipo de cáncer, tienen características biológicas diferentes como el tipo de VPH, lo que resalta que la heterogeneidad inter-tumoral pudiera ser relevante para establecer la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC para el caso del Cacu.

1.1 ABSTRACT

Cancer is characterized by cellular heterogeneity both inter-tumoral and intra-tumoral. This heterogeneity represents a challenge in the clinical field, so many models have been proposed to explain it. Within these, the Plasticity Model is the most recent and it is the closest to data described in cancer. In this model, it is proposed that the Cancer Stem Cells (CSC) constitute the base of this heterogeneity, besides being key to initiate and maintain tumor growth. For this reason, many studies have focused on studying CSC in different types of cancer, such as Cervical-Uterine Cancer (CC).

One of the characteristics of CSC is the activation of the WNT/ β -catenin signaling pathway, which it has been associated with cancer and it is now proposed relevant for CSC. In CC, a deregulation of the WNT/ β -catenin pathway has also been described, but its role in CSC has not yet been defined. This is partly because, one of the challenges in studying CSC is that, in most cases, they represent a low percentage compared to the total number of cells within a tumor. For this reason, to enrich CSC *in vitro*, the sphere culture has been a useful tool that in combination with the use of the enzyme Aldehyde Dehydrogenase (ALDH), specifically its high activity (ALDH^{HIGH}) as cellular marker of the CSC, offer the opportunity to evaluate the relationship between the WNT/ β -catenin pathway and the CSC in CC.

Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the WNT/ β -catenin pathway in HeLa and SiHa, two cell lines from CC, both in monolayer culture and spheres culture. Moreover, the percentages of CSC, referred to as ALDH^{HIGH}, were analyzed after activating or inhibiting the WNT/ β -catenin pathway.

The results showed that the components of the WNT/ β -catenina pathway are present in both HeLa and SiHa cells, in addition to show a basal activation in monolayer cultures. However in spheres cultures, this activation increased in HeLa while it decreased in SiHa, suggesting that the relationship between WNT/ β -catenin pathway and CTC is dependent on the cell line under study. According with this, when activating WNT/ β -catenin pathway, the percentage of ALDH^{HIGH} in HeLa decreased, while it increased in SiHa in monolayer cultures. Conversely, by inhibiting this pathway, the percentage of ALDH^{HIGH} cells in HeLa and SiHa increased and decreased, respectively. These results indicate that, although HeLa and SiHa cells come from the same type of cancer, they have different biological characteristics such as the type pf HPV, which highlights that the inter-tumoral heterogeneity could be relevant to establish the relationship between WNT/ β -catenin pathway and CSC in the CC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ¿Qué es el cáncer?

El cáncer definido por la Organización Mundial de la Salud, es el grupo de enfermedades que afectan a cualquier parte de un organismo y que se caracteriza por una multiplicación rápida de células anormales, extendiéndose más allá de sus límites habituales hasta invadir partes adyacentes o propagarse a otros órganos.

En el inicio de un cáncer, las células normales cambian de manera progresiva adquiriendo nuevas características que les permiten dar lugar a un tumor, el cual es una masa de tejido formado por células que proliferan de manera desregulada y que no tiene alguna función fisiológica aparente. El tumor puede crecer sin propagarse a otros órganos, por lo que se denomina tumor benigno; sin embargo al invadir otras zonas dentro del mismo tejido u otros órganos se le considera como un tumor maligno o canceroso.

Un tumor canceroso es tan complejo que se divide en características específicas que permiten entender parte de los procesos en el desarrollo de un tumor y también entender parte de las implicaciones clínicas que puedan presentarse (Hanahan D & Weinberg RA 2011; Vogelstein B 1993). Cada una de estas características específicas está detrás de una o varias capacidades celulares que llevan a las células cancerosas a sobrevivir, proliferar y diseminarse a lo largo del organismo. Estas características específicas pueden originarse de cambios en la secuencia genómica, a través de distintos mecanismos que pueden o no, compartirse entre los diferentes tipos de cáncer. Uno de los mecanismos más descritos son las mutaciones, las cuales pueden darse de forma espontánea o como consecuencia de la exposición a factores físicos, químicos o biológicos derivados del medio ambiente, como en el caso del Cáncer Cérvico-Uterino (Cacu) tras la exposición al Virus del Papiloma Humano (VPH) (Saeki H & Sugimachi K 2001), sin embargo la existencia de otros mecanismos también contribuyen a estos cambios en la secuencia genómica.

Estos cambios en el genoma a nivel de secuencia junto con el fondo genético del hospedero y las presiones selectivas del microambiente dentro de un tejido, llevan a que un tumor se forme de células biológicamente diferentes, que funcionan de manera integral para permitir su crecimiento y mantenimiento. Estas diferencias entre las células tumorales, se le llama heterogeneidad celular y representa el mayor desafío para entender y contender contra el cáncer, por lo que se explica con mayor detalle en el siguiente apartado.

2.2 Heterogeneidad en el cáncer

Cada vez es mayor la evidencia de que un tumor va más allá de un conjunto de células cancerosas en proliferación, sino más bien es una organización compleja similar a un tejido normal donde interaccionan diferentes tipos de células. Actualmente, se describe que esta organización se sostiene principalmente de una heterogeneidad genética, fenotípica y funcional entre las células cancerosas.

La heterogeneidad genética existe, porque dentro del tumor hay cambios genéticos que dan lugar a genotipos diferentes en células individuales, aun proviniendo del mismo tumor (Campbell PJ 2010; Shah SP 2009). Ejemplos como la leucemia mieloide aguda (Walter MJ 2012), la leucemia linfocítica crónica (Schuh A 2012), el cáncer de seno (Navin N 2011; Shah SP 2012), el carcinoma de células renales (Xu X 2012; Gerlinger M 2012) y el cáncer de páncreas (Campbell PJ 2010) se describen como genéticamente muy heterogéneos. Inclusive, se ha observado que en un mismo tumor, este tipo de heterogeneidad cambia conforme avanza la enfermedad (Burrell RA 2013).

La heterogeneidad genética puede llevar a una expresión diferencial de los genes. Existen diversos genes que actualmente se consideran como característicos del cáncer como: *c-myc*, *ciclinas*, *ki67*, *bcl2*, *c-kit*, *ras* y *egfr*, los cuales se expresan en diferentes niveles dentro de un mismo tumor (Sun XX 2015). No obstante con el avance de la tecnología se ha logrado examinar los perfiles de expresión genética en células individuales, para conocer un mejor panorama acerca de este tipo de heterogeneidad. Esto ha permitido saber que, por ejemplo, en muestras de glioblastoma, los perfiles de expresión genética son más similares entre las células del mismo tumor que entre las células de diferentes tumores; aunque también hay una variación entre las células del mismo tumor, especialmente en genes relacionados con múltiples funciones celulares (Patel Ap 2014).

La heterogeneidad genética también puede reflejarse en las proteínas, lo que explica en parte, la heterogeneidad fenotípica que se refiere a las proteínas diferencialmente expresadas entre células de un mismo tumor, así como sus diferencias morfológicas que están detrás de la diversificación en la histología de los tumores (Heppner GH 1984). De manera relevante, a pesar de que la heterogeneidad genética como fenotípica se han logrado describir en un mismo modelo de estudio, es importante mencionar que no solo las diferencias genéticas dan lugar a la heterogeneidad fenotípica, sino también otros mecanismos, como la epigenética o la diferenciación celular (Park SY 2010; Navin N 2010).

La heterogeneidad genética y la fenotípica no son los únicos tipos de heterogeneidad que se describen en los tumores, sino también la heterogeneidad funcional que resulta importante desde un enfoque clínico. La proliferación celular, como proceso clave en el crecimiento y desarrollo de un tumor, ha mostrado ser diferente en las células de un mismo tumor humano (Clarkson B 1970; Killmann SA 1963). Estas diferencias funcionales también se han observado en la capacidad de formar nuevos tumores, donde células auto-trasplantadas en humanos muestran diferencias en iniciar y sostener un tumor (Southam C 1962), lo que concuerda con lo observado en modelos de trasplantes singénicos en ratones (Bruce WR & Van Der Gaag H 1963; Hewitt HB 1958).

Otra diferencia funcional que resulta crucial para la medicina, es la respuesta diferente que tienen las células cancerosas ante un mismo fármaco (Heppner GH 1978). De manera interesante, es hasta en los años recientes donde se sugiere que estas diferencias no necesariamente se deben a cambios en las secuencias genómicas, sino a otros mecanismos como los epigenéticos o la diferenciación celular (Kreso A 2013).

Como se ha mencionado, existe una heterogeneidad en las características biológicas de las células tumorales y como primera estrategia para entender esta heterogeneidad, se ha clasificado principalmente en dos tipos: la heterogeneidad intra-tumoral y la heterogeneidad inter-tumoral. La heterogeneidad intra-tumoral se refiere a todo tipo de variación que existe entre las células que forman un mismo tumor, mientras que la heterogeneidad inter-tumoral es cualquier variación que existe entre las células tumorales de un paciente y las células tumorales de otro paciente con cáncer en el mismo órgano de origen. Ambos tipos toman un lugar clave por sus implicaciones clínicas, que deben tomarse en cuenta en el campo médico (Fig. 1). Del mismo modo, se vuelve primordial entender las posibles causas que originan esta heterogeneidad tumoral y del cual, diversas ideas han surgido y que se discuten en el siguiente apartado.

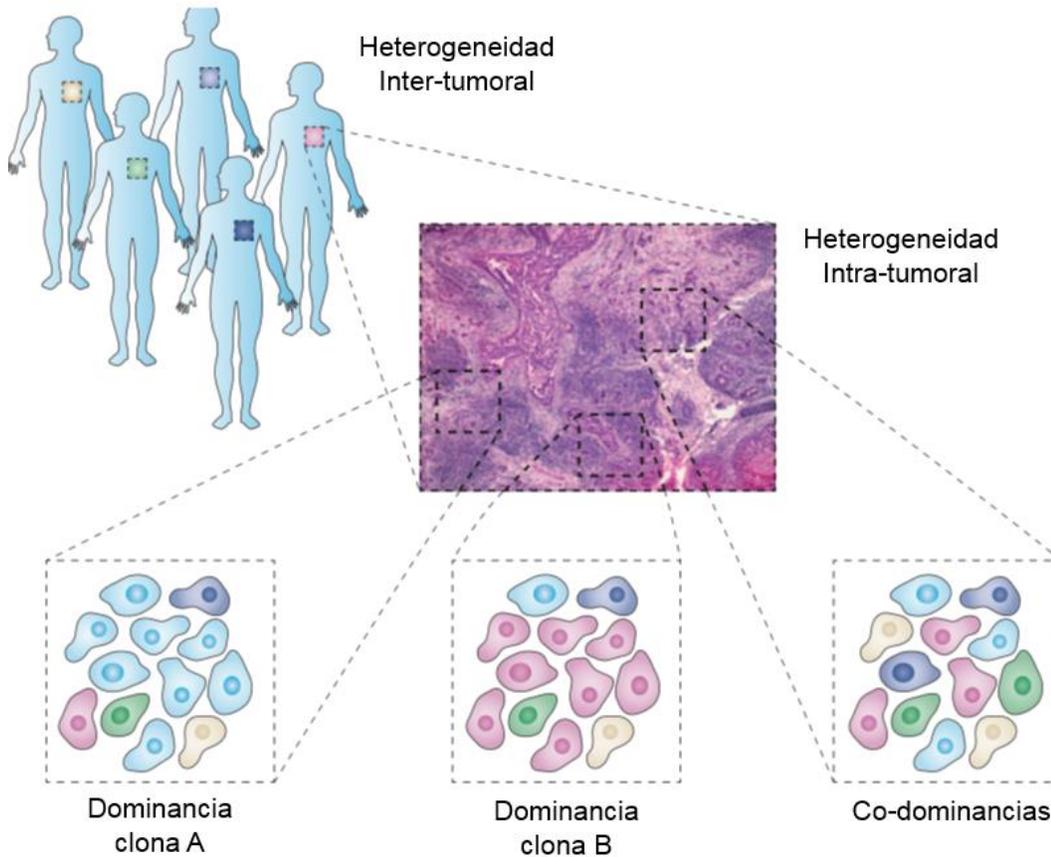


Figura 1. Heterogeneidad tumoral. Las diferencias entre las células tumorales pueden clasificarse en heterogeneidad inter-tumoral y heterogeneidad intra-tumoral. Ambas heterogeneidades tienen implicaciones clínicas como en el diagnóstico. La figura representa que, una biopsia puede no reflejar toda la composición biológica de un tumor, porque las subpoblaciones celulares pueden distribuirse desigualmente, con dominancias celulares en espacio y tiempo específicos. Además la dominancia de subpoblaciones celulares en una biopsia, puede encubrir subpoblaciones celulares minoritarias, las cuales pueden tener características biológicas y clínicas importantes. Imagen tomada y modificada de Marusyk A 2012

2.3 ¿Cómo explicar la heterogeneidad en el cáncer?

La diversidad de las células cancerosas enfatiza la necesidad de entender el comportamiento de las células individuales en el contexto de poblaciones celulares, ya que desde un enfoque clínico, los tratamientos pudieran no incluir como blanco a todas las células dentro de un tumor, dejando la posibilidad de que las células cancerosas residuales pudieran ser las responsables de una reincidencia en el desarrollo del cáncer. Es por esto que se han propuesto modelos que expliquen dicha heterogeneidad (Fig. 2), entre los que sobresalen: el Modelo de Evolución Clonal, el Modelo Jerárquico y el Modelo de Plasticidad y los cuales se explican a continuación.

2.3.1 Modelo de Evolución Clonal

En 1976 Peter Nowell fundó la teoría evolutiva del cáncer, donde propuso que la mayoría de los tumores se originan de una sola célula, la cual al proliferar da lugar a una clona inicial (Nowell PC 1976). A partir de esta clona inicial, cada célula puede sufrir de una o varias alteraciones genéticas que permite la formación de subclonas diferentes. Dentro de estas subclonas diferentes, se seleccionan las más agresivas, de manera análoga a una selección tipo Darwiniano; pero en este caso

las células cancerosas están en una constante selección por parte del microambiente para sobrevivir, proliferar o diseminarse a lo largo del organismo.

Por lo tanto, este modelo busca explicar al cáncer como un proceso evolutivo donde a partir de una clona original se van adquiriendo alteraciones genéticas de manera secuencial, conforme las células continúan proliferando. Estas alteraciones genéticas ocurren de manera estocástica y llevan por ejemplo, a modificar genes que regulan el ciclo celular o la supervivencia. Aunque no todas las alteraciones genéticas representan una ventaja para la célula tumoral y su progenie, aquellas que sí lo son, permiten una selección secuencial de estas subclonas dejando atrás a las subclonas que no lograron una alteración genética que representara una ventaja. Como consecuencia, las subclonas seleccionadas son dominantes y poseen un potencial tumorigénico similar (Nowell PC 1976; Fialkow PJ 1976; Southam C 1961).

A pesar de que las alteraciones genéticas se asocian principalmente a las mutaciones, dado que son las más descritas; actualmente se sabe que también existen otros mecanismos como: la supresión o la inserción de regiones genómicas, los rearrreglos estructurales en los cromosomas o los cambios en el número de copias de genes; que ya en conjunto forman parte de la base genética que diversifica a las células dentro de un tumor.

De manera relevante, analizar las alteraciones genéticas ofrece una oportunidad de definir los posibles mecanismos detrás de la heterogeneidad genética en un tumor canceroso, y por tanto entender parte de la heterogeneidad fenotípica y la heterogeneidad funcional que pueden derivarse de esta heterogeneidad genética. A partir de estudios donde se ha secuenciado el genoma completo, ya sea de células individuales o de regiones particulares de un tumor, se apoya la idea de que el Modelo de Evolución Clonal está detrás de la heterogeneidad tumoral (Gerlinger M 2012; Navin N 2011). Sin embargo también se describe que las alteraciones genéticas encontradas en el genoma de una célula cancerosa pueden ser temporales, por lo que se requiere de un análisis detallado tanto cualitativo como cuantitativo de un gran número de cambios genéticos, que lleven a definir la evolución clonal subyacente detrás del desarrollo de un tumor canceroso en específico, en un momento dado en particular, y por tanto y lo más importante, permita predecir el posible comportamiento clínico para cada caso.

Adicionalmente, las alteraciones genéticas están sujetas a factores ambientales que pueden afectar la frecuencia con la que aparecen, es decir, si hay un factor ambiental carcinógeno, como la radiación ultravioleta o el tabaco, se incrementa de manera dramática el rango con el que se generan los cambios genéticos. Si estos cambios genéticos tienen como blanco a genes claves en mantener la integridad del genoma, puede resultar en aún un mayor rango de cambios genéticos con patrones específicos o inespecíficos (Loeb LA 2011). A pesar de esto, la inestabilidad genética no solo se causa por alteraciones genéticas en genes que controlan la integridad genómica, sino también por eventos epigenéticos como la hipermetilación, el remodelamiento de la cromatina y las modificaciones de histonas (Laird PW 2005)

Es importante tener en cuenta que, estas alteraciones genéticas también dependen de las diferencias en el microambiente dentro de un mismo tumor, el fondo genético del hospedero y de las características de cada alteración genética previa, lo que desencadena en la divergencia de las características biológicas de las células cancerosas que justifica la heterogeneidad tumoral.

2.3.2 Modelo Jerárquico

Los tumores presentan una organización tan compleja y similar a un tejido normal; que el inicio y desarrollo de un tumor se ha comparado con la formación de un tejido durante el desarrollo embrionario, lo que también implica una analogía con la organización jerárquica que se da en este proceso. Esta analogía con características embrionarias ha sido propuesta desde hace ya varios años.

En 1875 Cohnhelm propuso la Teoría del Resto Embrionario (conocido en inglés como: “*Embryonal-Rest Theory*”) donde sugiere que el remanente de células tipo embrionarias en los tejidos adultos desarrolla el cáncer de manera espontánea.

Posteriormente Vinnitsky propuso la Teoría Oncogerminativa (conocido en inglés como: “*Oncogerminative Theory*”) en la cual los cambios en las células normales que llevan a iniciar un tumor, se basan en la activación de mecanismos moleculares del desarrollo embrionario (Vinnitsky VB 1993). Por su parte, Lloyd J Old describió que los procesos del desarrollo de la célula germinal y el desarrollo de un tumor canceroso compartían características similares (Old LJ 2007), proponiendo cierta similitud entre las células del desarrollo embrionario y las células cancerosas.

De manera general, estas ideas giraban en torno a la propuesta de que ciertas células con características particulares eran claves para iniciar y desarrollar un tumor. Sin embargo, esto se consolida con el trabajo de Bonnet y Dick en un modelo de Leucemia Mieloide Aguda, donde al transplantar células cancerosas humanas con un inmunofenotipo CD34⁺/CD38⁻ en ratones inmunosuprimidos NOD/SCID, observan que se recapitula la enfermedad en comparación a células con inmunofenotipos diferentes; demostrando entonces la presencia de células claves en la tumorigénesis. Incluso, las células CD34⁺/CD38⁻ fueron similares con las células troncales hematopoyéticas en cuanto a la expresión de los marcadores de superficie celular, la proliferación, la auto-renovación y la capacidad de diferenciación (Bonnet D & Dick JE 1997). Dada esta similitud entre las células cancerosas tumorigénicas con las células troncales normales, se les denominó Células Troncales Cancerosas (CTC), término que se emplea a lo largo de este trabajo.

Para los tumores sólidos, fue el trabajo del grupo de Al-Hajj en un modelo de cáncer de seno, en el que tras inyectar células cancerosas humanas con un inmunofenotipo CD44⁺/CD24⁻ en glándulas mamarias de ratones inmunosuprimidos NOD/SCID, observaron una recapitulación de la enfermedad. Al realizar los trasplantes seriales de las células con el mismo inmunofenotipo, se mantuvo la capacidad de originar un tumor, que además mantuvo la heterogeneidad celular (Al-Hajj M 2003).

Inicialmente se pensó que estos experimentos subvaloraban la capacidad tumorigénica de las demás subpoblaciones celulares dado que fueron xenotrasplantes, sin embargo trasplantes singénicos en ratones mostraron mayor capacidad tumorigénica en solo ciertas subpoblaciones celulares específicas, apoyando la idea de una jerarquía celular dentro del tumor, donde las CTC resultan ser las más importantes (Vaillant F 2008).

A diferencia del Modelo de Evolución Clonal, donde las células evolucionan en subclonas hasta alcanzar un potencial tumorigénico similar; el Modelo Jerárquico postula la presencia de las CTC, que son las células más tumorigénicas, que perduran por auto-renovación y que dan lugar al resto de las células cancerosas con una proliferación y un potencial tumorigénico más limitados.

El hecho de que existan células con capacidad de recapitular el cáncer mientras que otras no, aun derivando del mismo paciente, señala que coexisten poblaciones celulares con propiedades biológicas

diferentes, incluyendo la capacidad de iniciar y mantener el crecimiento de un tumor (Reya T 2001; Marx J 2003; Pardal R 2003; Dalerba P 2007).

Además, debido a la presencia de marcadores de diferenciación de células normales en células cancerosas, este modelo sostiene que la heterogeneidad dentro de un tumor se alcanza por la diferenciación de las CTC, dado que son las de menor grado de diferenciación dentro de un tumor.

A pesar de que, el Modelo Jerárquico propone una explicación a la heterogeneidad fenotípica y funcional entre las células cancerosas, la dificultad en identificar a CTC en cada modelo experimental y muestra de paciente, sumado a la variación en los modelos *in vitro* e *in vivo* e incluso las diferencias entre los pacientes, han puesto en duda si este modelo es adecuado para explicar lo descrito en la mayoría de los tipos de cáncer (Magee JA 2012), por lo que se ha propuesto un modelo más reciente como lo es el Modelo de Plasticidad.

2.3.3 Modelo de Plasticidad

El Modelo Jerárquico ha resultado controversial dado que la descripción de las CTC no ha sido evidente para diversos estudios (Rosen JM 2009). Por ejemplo, las células aisladas de melanoma formaron tumores y recapitulaban la heterogeneidad tumoral, pero no se identificó un inmunofenotipo en particular para estas capacidades, por lo que la presencia de células más tumorigénicas no fue evidente, es decir de CTC (Quintana E 2010).

Por otro lado, también hay estudios que se contradicen al buscar establecer si existen las CTC para ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo en modelos de adenomas intestinales, las células LGR5⁺, inmunofenotipo propuesto para las CTC en este tipo de cáncer, contribuyen al crecimiento tumoral y generan a las células LGR5⁻ (Schepers AG 2012). Sin embargo, en otro estudio se señala que tanto las células LGR5⁺ como las células LGR5⁻ forman tumores de manera similar y ambos dan lugar a células LGR5⁺ y LGR5⁻, lo que pone en duda si en verdad existen las CTC en este tipo de cáncer o si LGR5 es un marcador celular adecuado para identificarlas (Schwitalla S 2013).

Esto junto con otros reportes, ha llevado a postular un nuevo modelo que incluya estas diferencias experimentales, ya que aun en los cánceres que siguen una clara jerarquía, con presencia de CTC, existen otras fuentes de heterogeneidad como la evolución clonal (Burrell RA. 2013) y los cambios en el microambiente (Calabrese C. 2007; Charles N. 2010; Junttil MR. 2013), por lo que considerando también estos factores, surge el Modelo de Plasticidad, el cual puede aproximarse más a lo descrito en el cáncer.

El Modelo de Plasticidad toma en cuenta parte del Modelo Jerárquico y parte del Modelo de Evolución Clonal, para explicar la heterogeneidad tumoral. Por ejemplo, en tumores colorectales, un tipo de cáncer descrito como jerárquico con presencia de CTC, se han detectado variantes genéticas *de novo* en tumores trasplantados serialmente, en comparación a las muestras primarias de pacientes (Kreso A 2013), lo que sugiere que a través de la diferenciación de las CTC (modelo jerárquico) pueden existir alteraciones genéticas (modelo de evolución clonal). Esto apoya la idea de que las células cancerosas, aun siendo las CTC, pueden cambiar entre estados que les permitan contribuir más o menos al desarrollo tumoral (Gupta PB 2011). Como implicación del Modelo de Plasticidad, las CTC pasan de ser un estado estático bien definido con características funcionales invariables a ser un estado que puede seguir cambiando. Este modelo también considera lo reversible, es decir donde cualquier célula puede alcanzar un estado más tumorigénico con características de CTC, en respuesta a estímulos externos (Mani SA 2008). Sin embargo, esta reversibilidad solo se ha observado *in vitro* y frecuentemente en líneas celulares, como en líneas celulares de cáncer de pulmón, donde las

jerarquías existen pero no son estáticas, y que mecanismos (posiblemente epigenéticos) llevan a cambios temporales y reversibles que se reflejan en adquirir características atribuidas a las CTC como lo es, la resistencia a fármacos (Sharma SV 2010).

Por tanto, la conversión entre estadios que llevan a contribuir más o menos al inicio o mantenimiento de un tumor, puede darse de manera bidireccional, lo que añade un grado de complejidad que no se había considerado en el modelo de Evolución Clonal o en el Modelo Jerárquico, pero sí en el Modelo de Plasticidad. Esto también toma en cuenta que las células cancerosas pueden diferenciarse hacia otro tipo de células como: las células de soporte de cáncer tipo nicho (Tammela T 2017), las células de cáncer tipo endotelial (Weis SM 2011) o las células de cáncer tipo fibroblasto (Mao Y 2013)

Por tanto el Modelo de Plasticidad ayuda a entender con mayor aproximación la heterogeneidad tumoral, no solo como cambios irreversibles dictados por la diferenciación de las CTC o como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas por la evolución clonal, sino como un sistema más complejo fundamentado en ambos procesos que pueden suceder de manera simultánea.

Finalmente y sumado a esto, es de considerarse que la variación entre los pacientes (la heterogeneidad inter-tumoral) implica hacer ajustes en este modelo, que si bien es cierto que es el más aproximado, no es definitivo, ya que algunos autores consideran que si la heterogeneidad genética en un tumor es baja, la principal causa de la heterogeneidad fenotípica y funcional, mas no la única, es la diferenciación de las CTC. Mientras que, si existe una alta heterogeneidad genética, entonces las heterogeneidades fenotípica y funcional no son solo un reflejo de la diferenciación de las CTC, sino de una evolución clonal (Meacham CE 2013).

El Modelo de Plasticidad también tiene implicaciones clínicas, pues las terapias anticáncer podrían formar parte del grupo de factores que llevan a las células tumorales a cambiar de estados más tumorigénicos a menos tumorigénicos (o viceversa), además del papel que juegan el microambiente y el fondo genético del paciente (Chaffer CL 2011; Iliopoulos D 2011). Esto refuerza el hecho de que, las ideas acerca de las CTC y la evolución clonal resulten más complementarias que opuestas, donde el Modelo de Plasticidad es el que las unifica.

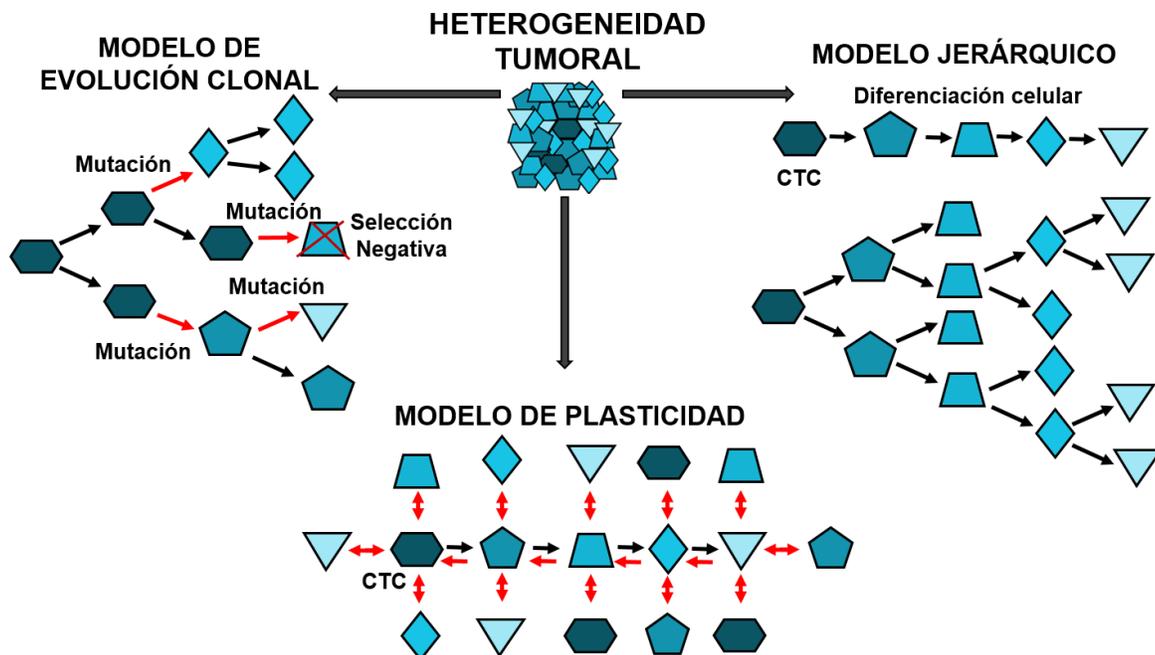


Figura 2. Modelos para la heterogeneidad tumoral. Se han postulado 3 modelos para explicar la heterogeneidad tumoral. **A. Modelo de Evolución Clonal.** Las células tumorales sufren de constantes alteraciones genéticas debido a la presión selectiva del microambiente, lo que da lugar a subclonas con diferencias biológicas, pero con un potencial tumorigénico similar. **B. Modelo Jerárquico.** Existe una subpoblación celular, formada de CTC, la cual es más tumorigénica y al diferenciarse da lugar a las demás células cancerosas, con diferentes estadios de diferenciación, lo que sostiene la heterogeneidad tumoral. **C. Modelo de Plasticidad.** Las CTC conforme se auto-renuevan o se diferencian, pueden tener alteraciones genéticas que llevan a que pierdan sus características. Simultáneamente células no tumorigénicas pueden adquirir características de CTC, lo que lleva a una heterogeneidad genética, fenotípica y funcional.

2.4 Células Troncales Cancerosas (CTC)

El Modelo Jerárquico y el Modelo de Plasticidad consideran a las CTC como células importantes en el desarrollo de un tumor, por lo que en este apartado se describen las características biológicas que se han propuesto para estas células.

Partiendo de que, las células troncales normales se definen como células con la habilidad de perpetuarse a sí mismas a través de la auto-renovación y de generar células con diferentes grados de diferenciación, propias de uno o varios tejidos (Reya T 2001), en el caso de las CTC se establecen 5 criterios que incluyen estas y otras características (Dalerba P 2007; Clarke MF 2006) y que se describen a continuación:

2.4.1 La capacidad de auto-renovación

La auto-renovación es la capacidad biológica donde una célula troncal al dividirse, da lugar al menos a una célula con el mismo grado de diferenciación celular que la célula de origen, por lo que su potencial proliferativo y su potencial de diferenciación no se afectan tras la división celular.

En la auto-renovación, existen dos tipos de división celular: la división simétrica, en la cual la célula troncal produce dos células similares a la célula troncal original, es decir dos células troncales; y la división asimétrica, en la cual la célula troncal produce una célula similar a la célula troncal original y una célula con un mayor grado de diferenciación.

En condiciones normales, la auto-renovación permite que la población de células troncales se mantenga o se expanda a lo largo de la fase adulta de un organismo. En el caso de un tumor canceroso, la auto-renovación de las CTC permite que estas células se mantengan con la misma capacidad proliferativa a lo largo del desarrollo del tumor, mientras que a la vez también dan lugar al resto de las subpoblaciones celulares que forman el tumor.

Se sugiere que, la auto-renovación sirve para entender la competencia y la selección clonal, u otras características como la aparición de una resistencia a un fármaco dentro de un tumor, lo que resulta importante desde un punto de vista clínico. De manera interesante, a través de un modelo matemático se ha señalado que, la auto-renovación es crucial para la expansión de las células cancerosas y la diversidad clonal; además de que la autorenovación de las CTC en combinación con una baja proliferación de las demás células cancerosas, permite un crecimiento tumoral más rápido, a pesar de una terapia (Stiehl T 2017).

Los mecanismos de auto-renovación que permiten que las células troncales normales persistan, involucra vías asociadas a procesos tumorigénicos como WNT, Hedgehog y Notch, siendo que son estas mismas vías importantes para las CTC, al menos por lo descrito en ciertos tipos de cáncer (Reya T 2001; Taipale J & Beachy PA 2001).

Finalmente, se ha sugerido que en algunos tipos de cáncer, las CTC se originan de células troncales normales que sufren de alteraciones genéticas, por lo que la auto-renovación podría ser una capacidad inherente (Sell S 1994). Sin embargo, también se propone que células más diferenciadas o progenitores restringidos pueden adquirir la capacidad de auto-renovación como resultado de alteraciones genéticas (Reya T 2001; Pardoll R 2003).

2.4.2 El potencial tumorigénico

Las células cancerosas pueden tener la capacidad de formar un nuevo tumor, ya sea dentro del mismo organismo donde se originaron, o en otro organismo al ser trasplantadas, siendo clave esta capacidad en la reincidencia de un paciente con cáncer en el campo clínico. Para las células cancerosas que forman un tumor nuevo, se les ha dado el término de Células Iniciadoras de Tumor (TIC); sin embargo no necesariamente hacen referencia a las CTC; ya que las células transitorias también son capaces de formar un tumor nuevo (Krivtsov AV 2006), por lo que se debe tener precaución al comparar el término TIC con el término CTC, siendo que CTC implica los demás criterios explicados en este apartado y que deben ser evaluados.

En la capacidad de formar un tumor, se toma en cuenta el potencial tumorigénico, que es el número mínimo de células cancerosas provenientes de un solo organismo para recapitular la enfermedad en otro organismo. La mayoría de los reportes refiere que el potencial tumorigénico puede ir de 100 células a 50,000 células, siendo que a menor número de células implica un mayor potencial tumorigénico. Es importante resaltar que este potencial puede variar de acuerdo al tipo de células evaluadas, tipo de cáncer y condiciones experimentales. El método más utilizado para validar que las CTC inician un tumor nuevo, es a través de trasplantes ortotópicos o ectópicos en modelos de animales apropiados, como ratones NOD/SCID, que permiten recapitular la heterogeneidad fenotípica completa del tumor parental, a partir de densidades celulares bajas (Fulawka L 2014).

2.4.3 La diferenciación en células no tumorigénicas

El potencial de diferenciación es la habilidad de las células para llevar a cabo cambios morfológicos, funcionales y en el perfil de expresión de marcadores celulares, que en el caso de las CTC, incluye intercambiar marcadores propios de las células troncales por marcadores de células diferenciadas.

Las CTC se diferencian hacia uno o varios tipos celulares, similar a las células troncales normales, lo que justifica su importancia en la organización jerárquica dentro de un tumor. Esto también implica que, conforme las células cancerosas incrementan su grado de diferenciación, disminuyen su capacidad tumorigénica, y aunque continúan proliferando, son incapaces de establecer o mantener un crecimiento tumoral a través de trasplantes seriales (Clarke MF 2006). Esto significa que, las CTC se diferencian en células cancerosas no tumorigénicas, conforme a lo descrito desde el trabajo pionero de Al-Hajj en el cáncer de seno (Al-Hajj 2003) pero validado en otros tipos de cáncer (Huang Z 2015).

La diferenciación de las CTC se regula por factores intracelulares y extracelulares. En cuanto a los factores extracelulares, los medios de cultivo llevan a que las CTC puedan o no, diferenciarse en los tipos celulares propios del tejido canceroso, dependiendo de las señales del microambiente (Liu H 2013; Vermeulen L 2010; Yan K 2014). Respecto a los factores intracelulares, es la activación continua de las vías WNT, Hedgehog y Notch las que, no solo regulan la auto-renovación, sino también la diferenciación de las CTC (Takebe N 2015).

Por último, es importante mencionar que, la capacidad de diferenciación a menudo se considera como una propiedad exclusiva de las CTC; sin embargo se sabe que células no troncales pueden diferenciarse en distintos linajes, aún careciendo de la capacidad de auto-renovación; por lo que no se debe de tomar solo este criterio para clasificar a las células bajo estudio como CTC.

2.4.4 La expresión de marcadores celulares

Los marcadores celulares permiten identificar a células específicas, a través de la expresión determinada de proteínas, en especial aquellas proteínas en la membrana celular. Esta expresión de marcadores celulares es específica porque las células se encuentran en distintos estadios de diferenciación dentro del tumor, siendo las CTC las de menor grado de diferenciación, y por consiguiente con una expresión específica de proteínas.

Distintos marcadores celulares se han propuesto, pero en cada caso es importante establecer su relación con las CTC para cada modelo y para cada tipo de cáncer, ya que cada vez es más evidente que la expresión específica de las CTC puede variar (Li Y & Lateral J 2012). Esta variación se da en parte, por la heterogeneidad inter-tumoral ya que, por ejemplo, en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, las células leucemogénicas fueron CD34⁺/CD38⁻ para la mitad de los pacientes mientras que para la otra mitad fueron CD34⁺/CD38⁺ (Eppert K 2011). También esta variación puede deberse a cambios a lo largo de los trasplantes seriales, como se observó en un modelo de cáncer de ovario, donde las células tumorigénicas CD133⁺ tras un xenotrasplante dieron lugar a células tumorigénicas CD133⁻ por lo que, se debe ser cauteloso al proponer uno o varios marcadores celulares como específicos de las CTC (Stewart JM 2011).

Esta variación en los marcadores celulares, aunque considerada en el Modelo de Plasticidad, resalta la importancia de tomar en cuenta los demás criterios para poder asociarlos a las CTC. Esto mismo ha llevado a explorar otro tipo de marcadores celulares para identificar y aislar a las CTC, incluyendo el fenotipo de población lateral o el ensayo para medir la actividad de la enzima ALDH (Tirino V 2013),

siendo esta última la utilizada en el presente trabajo dado los antecedentes, y el cual se explica con mayor detalle más adelante.

2.4.5 Restricción a una minoría de la población total del tumor

En los primeros estudios se estableció que las CTC representan una minoría respecto al total de células que forman un tumor, aunque actualmente esto se debate ya que parece depender del tipo de cáncer y de las condiciones experimentales utilizadas. Por ejemplo, al usar un ratón NOD/SCID altamente inmunocomprometido, la detección de células que originaron el melanoma incrementó varias órdenes de magnitud, en comparación a los estudios anteriores (Quintana E 2008).

Además, también debe considerarse la plasticidad de las células cancerosas, lo que puede llevar a que la frecuencia de las CTC cambie a lo largo del tiempo. Un ejemplo de esto se observó en un modelo de papiloma benigno, donde mediante el rastreo de linaje, (conocido en inglés como: “*lineage tracing*”) se detectó que solo unas células contribuyeron al crecimiento tumoral, consideradas CTC, pero que su frecuencia aumentó conforme progresó a un carcinoma de células escamosas (Driessens G 2012). Inclusive modelos matemáticos proponen que, las CTC pueden ser de cualquier proporción posible dentro de un tumor (MD Johnston 2010).

A pesar de ésto en la mayoría de los casos, las CTC continúan siendo un bajo porcentaje en comparación al total de células que forman un tumor, por lo que diversas metodologías se han diseñado para poder enriquecerlas, es decir incrementar su porcentaje respecto al total de células y así estudiar sus características, al menos en condiciones *in vitro*. Una de éstas es la formación de esferas, la cual ha sido utilizada en diversos reportes y que también se empleó en el presente trabajo para el enriquecimiento de las CTC, por lo que se describe con mayor detalle en un apartado más adelante.

En resumen, los criterios descritos en este apartado que se han utilizado para validar la existencia de las CTC también explican, el porqué de la relevancia de este tipo de células en el campo clínico. No obstante, nuevas características se continúan atribuyendo a las CTC, por lo que nuevos criterios propuestos deben de ser evaluados y en su momento, considerados en las investigaciones futuras.

2.5 Actividad de ALDH como marcador celular de las CTC

Con el avance de la investigación en el campo del cáncer, es más tangible entender la complejidad de un tumor al estudiar los tipos de células que lo forman. Para identificar a un tipo de célula en particular, se han usado los marcadores celulares; que en el caso de las CTC, además de identificarlas deben permitir realizar ensayos funcionales que corroboren los demás criterios descritos en el apartado anterior, y así validarlas como CTC. En la actualidad, un marcador que cumple con estos requisitos y que se utiliza ampliamente es la alta actividad de la enzima Aldehído Deshidrogenasa (ALDH).

ALDH es una enzima responsable de la oxidación de los aldehídos intracelulares en los correspondientes ácidos carboxílicos. Un ejemplo es la oxidación del retinaldehído al ácido retinoico, que resulta importante en la diferenciación del desarrollo embrionario y en la homeostásis fisiológica en etapa adulta (Sophos NA and Vasiliou V 2003).

En el ser humano, la superfamilia de Aldehído Deshidrogenasas se compone de 17 miembros, dentro de los cuales el más descrito es el ALDH1A1 porque no solo cataliza la oxidación del retinaldehído al ácido retinoico, sino también participa en la oxidación de aldofosfamidias y aldofosfamidias, que son intermediarios de los fármacos anticáncer: ciclofosfamida e ifosfamida, respectivamente. En los

fármacos anticáncer, la oxidación hacia sus correspondientes ácidos las inactiva, por lo que convierte a ALDH en un factor clave en la detoxificación de las células durante la quimioterapia, lo que explica por qué la sensibilidad de las células cancerosas es inversa a los niveles celulares de ALDH1A1, tras la acción citotóxica de los agentes anticáncer como oxazafosforinas en modelos preclínicos (Sládek NE 2003; Sládek NE 1999). Esto, posiblemente debido a que, las Aldehído Deshidrogenasas tienen propiedades multifuncionales como la unión al andrógeno (Pereira F 1991), al flavopiridol (agente anticáncer bajo investigación) (Schnier JB 1999) o a la hormona tiroide (Zhou J 1997).

En las células troncales, tanto normales como cancerosas, la enzima ALDH es altamente activa y funciona para la detoxificación (Armstrong L 2004) y la proliferación (Kryczek I 2012); lo que demuestra que ALDH no solo es un marcador celular, sino que es importante en la funcionalidad celular.

Para analizar la actividad de ALDH dentro de las células, se desarrolló el reactivo *Aldefluor*, el cual inicialmente permitió analizar la actividad de ALDH1 en células troncales hematopoyéticas (Storms RW 1999), pero posteriormente, este mismo reactivo se utilizó para separar a las CTC de tejido de tumor y de líneas celulares cancerosas (Moreb JS 2008; Jiang F 2009). A partir de entonces, *Aldefluor* ha detectado exitosamente la actividad elevada de ALDH1 en CTC y progenitoras de cáncer de pulmón (Jiang F 2009), próstata (Li T 2010), seno (Charafe-Jauffret E 2010), colon (Huang EH 2009) y vejiga (Su y 2010), entre otros.

De manera concreta, *Aldefluor* contiene el sustrato BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA) que es convertido por ALDH en el producto BODIPY-aminoacetato (BAA), según se describe en la referencia del producto (Stem Cell Technologies). Las células vivas retienen BAA por su carga eléctrica y porque los transportadores de resistencia a multi-drogas, encargados de expulsar BAA, son inhibidos por el reactivo de *Aldefluor*.

Las células tratadas con *Aldefluor* presentan una fluorescencia proporcional a la actividad de ALDH que se detecta a nivel de células individuales. Esto permite distinguir principalmente dos subpoblaciones celulares: las células con mayor fluorescencia, es decir con alta actividad de ALDH (ALDH^{ALTO}) y las células con menor fluorescencia, lo que significa una baja actividad de ALDH (ALDH^{BAJO}) (Moreb JS 2008). No obstante, es importante tener en cuenta que las diferentes isoformas, y no solo ALDH1, también pueden ser responsables de la actividad de ALDH detectada por *Aldefluor*, pero esto depende del tipo de cáncer (Marcato P 2011; Muzio G 2012).

Para definir que en efecto, la población celular ALDH^{ALTO} identifica a las CTC, se han corroborado los demás criterios que definen a las CTC. Por ejemplo, en un modelo de cáncer de mama, la población celular ALDH^{ALTO} fue la fracción celular tumorigénica, capaz de auto-renovarse y recapitular la heterogeneidad de los tumores parentales. Respecto a generar células diferenciadas se reportó que las células ALDH^{ALTO} fue la población celular con mayor potencial de diferenciación *in vitro* y mayor potencial de crecimiento *in vivo* (Ginestier C 2007). Más aun, se observó que bloqueando la actividad de ALDH con el inhibidor DEAB o disminuyendo los niveles de su transcrito mediante un siRNA, se disminuyeron las CTC identificadas por inmunofenotipo e incluso, a nivel funcional se redujo la metástasis (Kim RJ 2013). Esto último coincide con estudios clínicos, donde los niveles de proteína de ALDH, se asocia con un peor pronóstico en el cáncer de pulmón (Shao C 2014), cáncer colorectal (Holah NS 2017), cáncer de seno (Marcato P 2015) y cáncer de ovario (Silva IA 2011). Por esta razón, incluso se ha considerado la inhibición de ALDH como una estrategia en contra de la resistencia de las células cancerosas (Raha D 2014).

Por lo tanto, a partir de estos y otros antecedentes, el empleo de *Aldefluor* ofrece una herramienta molecular mediante el cual, permite darle un seguimiento a las CTC en diversos modelos, incluyendo al Cacu, el cual fue de interés para este trabajo.

2.6 Cultivo de esferas para enriquecimiento de las CTC

Existen diversas estrategias moleculares y funcionales para estudiar a las CTC, dentro de las cuales, el cultivo de esferas ha sido de gran utilidad, por lo que es el método que se utilizó en el presente trabajo (Sugihara E 2013; Clarke MF 2006).

El cultivo de esferas se usa para el enriquecimiento de las CTC *in vitro*, particularmente en los casos en que las CTC son un bajo porcentaje respecto al número total de células de un tumor o de una línea celular. Este método se basa en la propagación clonal de células individuales, en un sustrato no adherente, por lo que conforme prolifera cada célula, se mantienen unidas las células que se originan y se forman las estructuras en flotación llamadas: esferas. Inicialmente, este método se instauró al cultivar células de cerebro, dando lugar a esferas que exhibieron propiedades de troncalidad (Reynolds BA and Weiss S 1992). Posteriormente el método se estableció en un modelo de cáncer, donde las primeras esferas derivaron de células cancerosas de cerebro (Singh SK 2003) y a partir de entonces, las esferas se han desarrollado de tumores sólidos como: cáncer de seno (Ponti D 2005), cáncer de pulmón (Eramo A 2008), cáncer de colon (Ricci-Vitiani L 2007) cáncer de próstata (Collins AT 2005), cáncer de páncreas (Li C 2007) y cáncer de ovario (Zhang S 2008).

Una característica de este método es que las células más diferenciadas mueren por anoikis, dada la falta de andamiaje por una matriz extracelular (Mehlen P & Puisieux A 2006), mientras que las células con características de troncalidad, como las CTC, sobreviven por diferentes mecanismos moleculares como la activación constitutiva de la proteína FAK (Dontu G 2003). En este método, la agregación celular debe prevenirse, ya que las células dependientes de anclaje pueden adherirse entre ellas para sobrevivir y proliferar, por lo que se utiliza una densidad celular baja que va de las 200 a las 20,000 células/ml para lograr una proliferación clonal.

A pesar de que las condiciones son no adherentes, las CTC requieren de un nicho específico (ambiente permisivo) que les permita la auto-renovación y la diferenciación (Borovski T 2011). En el caso de las esferas donde se carece de células estromales y de matriz extracelular; las células en la esfera pueden producir componentes de la matriz extracelular como la Tenascina C (Oskarsson T 2011), lo que señala que las mismas células pueden generar su propio nicho en una esfera.

Respecto al medio de cultivo, éste promueve la proliferación de las CTC a través de la presencia de factores de crecimiento y la ausencia de suero, aunque esto no excluye que también haya células progenitoras que se deriven de las mismas CTC. El hecho de que existan células provenientes de un mismo tumor en diferentes estadios de diferenciación, permite estudiar la heterogeneidad intra-tumoral en las esferas, mediante marcadores celulares, e incluso estudiar la heterogeneidad inter-tumoral al comparar esferas formadas de células de diferentes tumores (Vermeulen L 2010; Levina V 2010; Smart E 2013).

Más aun, es importante aclarar que la formación de esferas no reproduce totalmente el tumor del cual las células son derivadas, particularmente en su estructura y/o microambiente en condiciones *in vivo* (Valent P 2012); sin embargo las esferas no se usan para mimetizar la complejidad tridimensional de un tumor, sino más bien para estudiar las propiedades de las CTC a través de su enriquecimiento, ya

que pueden representar hasta cerca del 0.04% en un tumor, lo que inicialmente representa un desafío (Ichizawa K 2010). Más aún, los cultivos de esferas se consideran por algunos autores como criterio para las CTC, observándose por ejemplo, que las células que forman las esferas expresan exclusivamente OCT4 y SOX2, factores transcripcionales que se asocian a las CTC (Clarke MF 2006; Koestendauer S 2006).

A pesar de las ventajas que representa el cultivo de esferas, existe una variabilidad experimental que incluye la composición y el volumen del medio de cultivo, la densidad celular, el área superficial de la placa de cultivo y la duración del cultivo, lo que lleva a la necesidad de establecer las condiciones experimentales en cada caso en particular (Chaichana K 2006). Incluso, la relación entre las CTC y el cultivo de esferas debe tomarse con cautela, ya que existen casos donde la monocapa conserva mejor las características de las CTC que un cultivo de esferas, lo que corrobora que el enriquecimiento de CTC en un cultivo de esferas depende de las condiciones experimentales y el tipo de células cancerosas en estudio (Calvet CY 2014). De manera particular, en el Cáncer de Cacu, que es el tipo de cáncer de interés en el presente trabajo, ya se han establecido las condiciones para los cultivos de esferas, específicamente de las líneas celulares HeLa y SiHa, y se ha demostrado que en efecto, existe un enriquecimiento de CTC (Ortiz-Sánchez E 2016).

De manera general, una vez que se incrementa el porcentaje de las CTC, mediante el cultivo de esferas, se han definido diferentes características biológicas de estas células, como lo son las vías de señalización que regulan, ya sea una o varias de estas características biológicas. Entre estas vías, la vía WNT/ β -catenina, que es ampliamente referida, participa en la auto-renovación y la diferenciación de las CTC en diversos tipos de cáncer, por lo que resulta de importancia para el presente trabajo y por lo que se explica su relación con el cáncer y con las CTC en el siguiente apartado.

2.7 Vías de señalización detrás de las CTC

En el cáncer, ya sea en el inicio o durante el desarrollo de un tumor, las vías de señalización se reprograman para dar paso a las características específicas de las células cancerosas (Hanahan D 2000), siendo que también estas vías de señalización pueden interconectarse entre ellas. Esto explica porque una sola alteración genética puede cambiar múltiples características en las células normales. En este sentido, los genes más estudiados en el cáncer, son los que pertenecen a las familias: *ras* y *myc*, porque una sola alteración genética lleva a múltiples cambios en las capacidades celulares, como la proliferación, el metabolismo energético, la angiogénesis, la invasión y la supervivencia celular (Hanahan D & Weinberg RA 2011).

En específico, la expresión del gen *c-myc* se regula por la vía WNT/ β -catenina (He TC 1998), que como su propio nombre lo menciona, participa el co-activador transcripcional β -catenina. De manera interesante, la misma β -catenina puede afectarse tanto por *c-myc* como por *H-ras*, ya que al inducirse la expresión transgénica de estos genes se originan tumores en animales y también una alta frecuencia de mutaciones en el gen *ctnnb1*, que codifica para β -catenina (De La Coste 1996), lo que sustenta la relación entre la tumorigénesis y β -catenina.

Además del gen *c-myc*, β -catenina regula otros genes como *ccnd1*, que codifica para la Ciclina D1, la cual controla el ciclo celular, lo que explica porque una sobre-activación transcripcional mediada por β -catenina, causa una proliferación celular desregulada, característica clave en la tumorigénesis (Shtutman M 1999; Tetsu O & McCormick F 1999).

Posteriormente, también se observó que la transducción retroviral de la forma activa de β -catenina en un modelo *in vivo* de ratones transgénicos, aumentó la auto-renovación de las células troncales epidermales, al mismo tiempo que desarrollaron cánceres epiteliales (Zhu AJ & Watt FM 1999). Esto muestra que, además de asociar a β -catenina con la tumorigénesis, uno de los mecanismos celulares de esta asociación es a través de las células troncales (Wend P 2010). Como parte de esta idea, se reporta que al anular β -catenina en CTC en un modelo de formación de tumor *in vivo* en la piel, se disminuyó el crecimiento tumoral (Malanchi I 2008).

Las CTC tienen alteraciones en distintas vías de señalización, sin embargo aquellas que controlan la auto-renovación y que participan en el desarrollo embrionario en condiciones normales, son probablemente las más cruciales. Dentro de estas, la vía WNT/ β -catenina no solo es importante para las células troncales normales, sino que es crucial para el mantenimiento de las CTC en diferentes tipos de cáncer como: leucemia (Correa S 2012), cáncer de seno (Prosperi JR 2010), melanoma (Larue L 2006), adenoma colorectal (Greenspan EJ 2011) y cáncer de hígado (Cavard C 2008), aunque para el Cacú esta participación en las CTC aún no es evidente.

Por lo tanto, la vía WNT/ β -catenina no solo regula la tumorigénesis sino también participa en la funcionalidad de las CTC (Moghbeli M 2013; Wicha MS 2006), justificando entonces los diversos esfuerzos enfocados en utilizarla como blanco terapéutico, ya que da la posibilidad de bloquear tanto la auto-renovación de las CTC, como la proliferación del resto de las células cancerosas. Por esta razón, el presente trabajo se enfoca en la vía WNT/ β -catenina y por lo cual en el siguiente apartado se describen sus características.

2.7.1 Vía WNT

El nombre de esta vía proviene de las proteínas WNT, que es una familia de glicoproteínas secretadas que incluye 19 miembros en el ser humano (Kikuchi A 2011). Las proteínas WNT actúan como ligandos que se unen a receptores localizados en la membrana citoplasmática, activando así diferentes vías de señalización que modulan, por ejemplo en el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la diferenciación y la morfogénesis. Estos ligandos se pueden clasificar de acuerdo a si la señalización depende o no del coactivador transcripcional β -catenina. Por ejemplo, los ligandos WNT1, 2, 3, 3A, 8A, 10A y 10B activan la vía mediada por β -catenina, conocida como la vía WNT canónica o la vía WNT/ β -catenina. Mientras que, los ligandos WNT4, 5A, 5B, 6, 7A y 7B activan vías independientes de β -catenina, conocidas como vías WNT no canónicas, dentro de las cuales está la vía PCP y la vía del Calcio (Staal FJ 2008). También existen ligandos WNT como WNT11, que puede activar ambos tipos de vía (Tao Q 2005).

Respecto a la vía WNT/ β -catenina, tiene papeles cruciales en regular el destino celular, la proliferación y la supervivencia; mientras que las vías WNT no canónicas participan en la diferenciación, la polaridad celular y la migración (Nihers C 2012; Anastas JN 2013; Clevers H 2014). Sin embargo, ambos tipos de vías pueden comunicarse y coordinadamente regular procesos de mayor complejidad como el desarrollo embrionario, el mantenimiento de las células troncales, la homeostasis del tejido o la reparación de una herida (Clevers H 2014).

De manera específica, el presente trabajo se enfoca a la vía WNT canónica o dependiente de β -catenina, por lo cual en el siguiente apartado se describen sus mecanismos moleculares. Sin embargo, no se descarta que las vías WNT no canónicas tengan un papel complementario en el inicio y desarrollo del cáncer, ya que se ha propuesto por ejemplo, en modelos de carcinomas hepatocelulares, que la vía WNT canónica contribuye al inicio de un tumor y las vías WNT no canónicas continúan con el desarrollo de dicho tumor (Yuzugullu H 2009).

2.7.1.1 Vía WNT canónica o dependiente de β -catenina

En condiciones normales, la activación de la vía WNT/ β -catenina depende de la presencia del ligando específico extracelular WNT. En estado inactivo, es decir en ausencia del ligando WNT, β -catenina se localiza en el citoplasma y se fosforila secuencialmente en el residuo S45 por la cinasa CK1 α y en los residuos T41, S37 y S33 por la cinasa GSK3 β (MacDonald BT 2009; Nihers C 2012).

La interacción entre estas cinasas y β -catenina, se facilita por las proteínas de andamiaje: AXINA y APC, formando así un complejo multiproteico que garantice que β -catenina se fosforile. Una vez que β -catenina se fosforila en estos residuos, la proteína ligasa de ubiquitina llamada β -TrcP, ubiquitina a β -catenina para su posterior degradación a través del proteosoma. Por lo tanto, en un estado inactivo de esta vía, se mantienen bajos los niveles proteínicos de β -catenina en el citoplasma (Fig. 3A).

La activación de la vía, inicia cuando el ligando WNT es reconocido por un receptor con 7 pases transmembranales llamado Frizzled (FZD) (Bhanot P 1996). Además, se requiere de un co-receptor con un solo pase transmembranal llamado LRP, formando así el complejo WNT-FZD-LRP (Pinson KI 2000; Tamai K 2000).

Esto desencadena que, una proteína citoplasmática con expresión ubicua llamada Dishevelled (DSH) se fosforile por la señal WNT y se una directamente a FZD; mientras que, al mismo tiempo DSH interactúa con GBP, una proteína de unión a GSK-3 β , lo que recluta a GSK3 β a la membrana. Esto hace que GSK3 β ya no esté disponible para fosforilar a β -catenina en el citoplasma y entonces β -catenina se estabilice (Chen W 2003; Wong HC 2003; Li L 1999).

A la vez, LRP también se fosforila por la señal WNT e interacciona con proteínas citoplasmáticas como AXINA, reclutándola a la membrana y favoreciendo la disociación del complejo encargado de la fosforilación de β -catenina (Tamai K 2004; Mao J 2001).

Al disminuir la formación del complejo para la fosforilación de β -catenina, ésta se estabiliza en el citoplasma y aumentan sus niveles proteínicos, lo que favorece su translocación al núcleo (Logan CY 2004).

Una vez en el núcleo, β -catenina se asocia con factores transcripcionales de la familia TCF/LEF (TCF1, LEF1, TCF3 y TCF4), así como con miembros de la familia de acoplamiento "*Legless*" (BCL9 y BCL9L) y con co-activadores de la familia PYGO (PYGO1 y PYGO2) siendo estos dos últimos mediadores en la interacción con la cromatina (Fig. 3B).

En el estado inactivo de la vía, los factores transcripcionales TCF/LEF forman un complejo represor transcripcional con la proteína GROUCHO, el cual recluta deacetilasas de histonas (HDAC). Sin embargo en el estado activo, GROUCHO es desplazado por β -catenina, llevándolo de un complejo represor a un complejo activador. Otro ejemplo, es la interacción de β -catenina con PITX2, que también lo convierte de un represor a un activador transcripcional (Kioussi C 2002).

Además, β -catenina puede reclutar proteínas modificadoras de cromatina como CBP/p300, que es una proteína de unión a los elementos de respuesta a AMP cíclico, capaz de acetilar histonas y promover la activación transcripcional. Otro modificador de cromatina reclutado por β -catenina es BRG-1, componente del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF (Logan CY 2004). Estos mecanismos moleculares en el núcleo permiten finalmente, la transcripción de genes blancos como: *c-myc*, *fgf20*, *jag1*, *dkk1*, *cnd1* y *axin2*.

La vía WNT/ β -catenina se puede regular en diferentes puntos, como la interacción de las proteínas WNT con sus receptores, ya que inhibidores se unen a los ligandos WNT, como: SFRP y WIF1, e impiden el reconocimiento por los receptores. También proteínas como WISE y DICKKOPF (DKK) inhiben la vía al unirse a LRP. En particular, DKK además de unirse con alta afinidad a LRP, también se une a las proteínas KREMENS, las cuales llevan a la internalización de LRP, evitando así que LRP esté disponible para reconocer el ligando WNT (Itasaki N 2003; Glinka A 1998).

La activación de la vía WNT/ β -catenina incluso se regula en el núcleo por diferentes mecanismos. Por ejemplo, la proteína CHIBBY actúa como un antagonista de β -catenina; mientras que la proteína ICAT bloquea la unión de β -catenina con TCF y disocia los complejos de β -catenina-LEF-CBP/p300 (Logan CY 2004). Por su lado, TCF también puede regularse a través de fosforilaciones mediadas por las MAP cinasas NLK/Nemo, lo que disminuye la afinidad del complejo de TCF-LEF- β -catenina por el ADN.

Finalmente, dentro de los genes blancos de la vía WNT/ β -catenina, se describen reguladores negativos como el gen *naked*, que codifica para la proteína NKD que se une a DSH e inhibe la señalización por WNT. También está el gen *axin2*, que codifica la proteína AXINA2, que participa en formar el complejo de fosforilación de β -catenina, por lo que la transcripción de ambos genes lleva a una retroalimentación negativa.

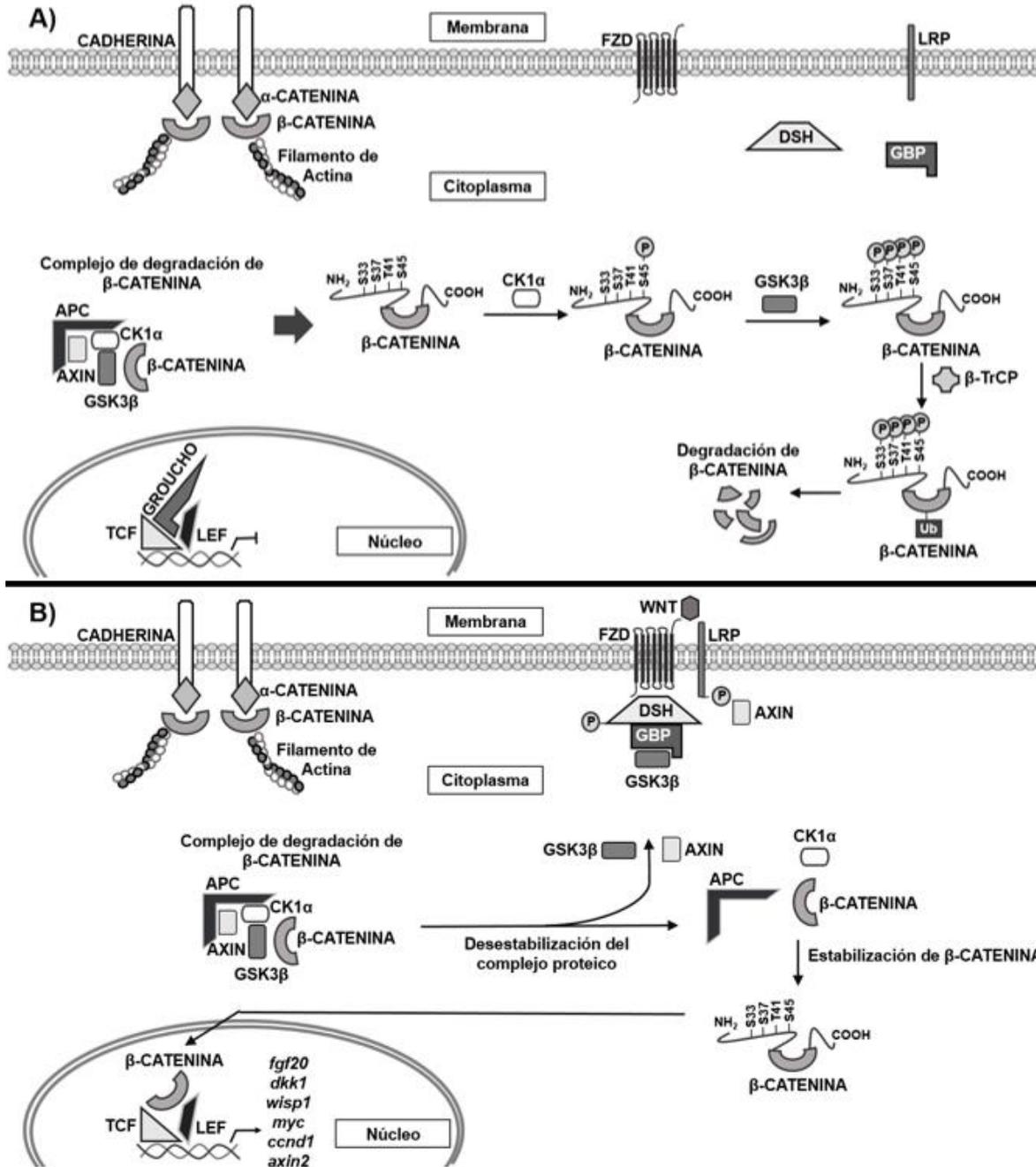


Figura 3. Esquema de la vía WNT dependiente de β -catenina. A. En el estado inactivo, los niveles citoplasmáticos de β -catenina se mantienen bajos debido al complejo encargado de su fosforilación y degradación. B. En el estado activo, los niveles citoplasmáticos de β -catenina aumentan dado que se desacopla el complejo responsable de su degradación. Dado este aumento, β -catenina se transloca al núcleo donde coactiva la transcripción de los genes blancos como *c-myc* y *ccnd1*.

2.7.1.2 Alteraciones de la Vía WNT/ β -catenina en el cáncer

La asociación entre la vía WNT y el cáncer se ha evidenciado desde el descubrimiento del gen *int1* (actualmente conocido como *wnt1*) en un modelo de cáncer de mama en ratón (Nusse R 1982). Posteriormente se observó que al sobre-expresar miembros de la familia WNT se expandieron las

células troncales de mama y aumentó la susceptibilidad de desarrollar cáncer en este tipo de tejido (Liu B 2004).

En cuanto a los componentes del complejo de fosforilación y degradación de β -catenina, se observó que el Síndrome del Cáncer Hereditario llamado FAP, fue consecuencia de mutaciones en el gen *apc*, incluso cerca del 80% de los casos analizados de cáncer de colon esporádico o hereditario mostraron defectos en este gen (Miyoshi Y 1992). Para el cáncer colorectal, la pérdida de APC incrementó los niveles proteínicos de LEF1, factor transcripcional que se une a β -catenina, desregulando así la expresión de los genes blancos dependientes de este complejo (Hovanes K 2001). También, mutaciones en el gen *axin2* llevaron a una predisposición para desarrollar cáncer de colon y aquellas que causaron la disfuncionalidad de AXINA se observaron en carcinomas hepatocelulares (Lammi L 2004; Satoh S 2000). Esto indicó que, mutaciones que favorezcan la estabilización de β -catenina pueden contribuir al desarrollo de algunos tipos de cáncer.

La estabilización de β -catenina también se da por mutaciones en esta misma proteína (Giles RH 2003), lo cual se describió inicialmente en la tumorigénesis del sistema nervioso central (Zurawel RH 1998) y de la piel (Chan F 1999). La mayoría de las mutaciones descritas en el gen *ctnnb1* (que codifica para β -catenina) son mayoritariamente en el exón 3, que codifica los sitios blancos para la fosforilación por GSK3 β , aunque también se describen mutaciones que afectan residuos adyacentes (Polakis P 2000). En el caso de las mutaciones en los sitios de fosforilación, β -catenina ya no depende de ligandos WNT para su estabilización, lo que lleva a una activación constitutiva de la transcripción de los genes blancos (Munemitsu S 1996). En el caso de los residuos adyacentes, puede afectar el reconocimiento del motivo para la ubiquitinación, lo que de igual manera estabiliza a la proteína de β -catenina o se afecta la interacción con APC, evitando la formación del complejo para la fosforilación de β -catenina, desencadenando de igual manera la activación de la vía.

No obstante, dependiendo del tipo de cáncer es la prevalencia de las mutaciones en β -catenina, siendo por ejemplo, de baja frecuencia en el cáncer de próstata (Voeller HJ 1998) y cerebro (Zurawel RH 1998) pero comunes en los cánceres hepatocelulares (Miyoshi Y 1998; De La Coste 1998). Es importante señalar que, a pesar de que las mutaciones en componentes de la vía WNT/ β -catenina, pueden no ser frecuentes en todos los tipos de cáncer, se puede dar la sobre-activación de esta vía por otros mecanismos moleculares como el silenciamiento epigenético de los antagonistas de esta vía, lo que también debe de considerarse al estudiar cada tipo de cáncer (Klarmann GJ 2008; Mazieres J 2004). Para fines de nuestro trabajo, el Cacú es el tipo de cáncer de interés, por lo que en el siguiente apartado se explica su relevancia y su relación con la vía WNT/ β -catenina.

2.8 ¿Por qué el Cáncer Cérvico-Uterino?

El Cáncer Cérvico-Uterino (Cacú) es el tercer tipo de cáncer más común de los tumores malignos y la cuarta causa de muerte entre a las mujeres a nivel global (Jemal A 2011). El Cacú representa alrededor del 8% de todos los cánceres diagnosticados en las mujeres (GLOBOCAN 2012) y se estima que por cada año, cerca de 500,000 mujeres presentan nuevos casos y aproximadamente 270,000 mujeres fallecen en los países en desarrollo (Saavedra KP 2012).

Dada la estrecha relación entre el Cacú y el VPH, se han realizado análisis de datos acerca de la infección con VPH a nivel mundial, mostrando que la prevalencia alcanza un máximo del 23% en mujeres menores de 21 años, sin embargo en la mayoría son temporales con una duración de unos pocos meses (Burchell AN 2006). Los datos transversales han mostrado que el tiempo entre la infección

persistente con VPH y las SIL de alto grado (lesiones pre-cancerosas) se estima de entre 7 y 15 años, considerando que el diagnóstico de SIL alcanza un máximo entre 30-35 años de edad (Bosch FX 2003). Respecto al Cacú, la edad de mujeres se sesga a edades más avanzadas, que tiende a ser 10 años más respecto a las mujeres con SIL de alto grado (Moscicki AB 2006), siendo entonces que la incidencia específica de edad del Cacú incrementa alcanzando un auge entre los 40 y 50 años de edad, seguido de un decline variable a partir de éste rango de edad (Gustafsson L 1997).

Sin embargo, es importante enfatizar que la incidencia específica de edad del Cacú es bipolar en varios países, es decir pareciera que existen dos rangos de edad con mayor número de casos. Esta idea se ve sustentada parcialmente por el hecho de que diversos estudios han observado un segundo pico de infección con VPH, aunque menos evidente, entre mujeres de mayor edad principalmente de 55 o más años (Franceschi S 2006). Bajo este argumento, existen estudios que indican un intervalo de tiempo entre el primer pico de infección con VPH (26-30 años) y el comienzo del Cacú en mujeres jóvenes (41-45 años) que es similar a sus contrapartes de mayor edad (Chan PK 2010).

Otro dato que es crucial explicar es en cuanto a la desproporción en la incidencia y mortalidad del Cacú entre países más desarrollados y menos desarrollados (o en vías de desarrollo), siendo que en estos últimos el Cacú es el segundo tipo de cáncer más común y es responsable de cerca del 85% del total de nuevos casos a nivel mundial (World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acceso: Agosto 10, 2018). Además, se señala que este tipo de cáncer representa el 7.5% de todos los casos de muerte en mujeres a nivel mundial, y de éstos el 87% ocurre en países menos desarrollados o en vías de desarrollo. Incluso hay países con un incremento de 18 veces en la mortalidad, lo que remarca una evidente variación entre las diferentes regiones del mundo (GLOBOCAN 2012 v1.0 Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acceso: Agosto 9, 2018). Otros autores indican que en países menos desarrollados, la máxima incidencia del Cacú se da entre 60 y 64 años, con rangos estimados de 90 casos por cada 100,000 mujeres, es decir 5 veces más en comparación a los países más desarrollados (Bosch FX 2013). Por lo tanto, estos datos exponen porqué en México, el Cacú sea aún una de las causas líderes de decesos entre las mujeres con cáncer.

En México, el Cacú es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia, donde el Instituto Nacional de Cancerología reportó 12,500 nuevos casos y 5,200 muertes en el 2010. Aunque la incidencia del Cacú ha disminuido en los más recientes años, en México existen poblaciones con un menor desarrollo y con una mayor tasa de mortalidad, ya sea por la falta de un diagnóstico oportuno y/o por un tratamiento tardío (Sánchez-Barriga 2012).

Esto a pesar de que, el rango de respuesta completa al tratamiento primario en los estadios tempranos está entre el 70% y el 90%, con una supervivencia general de cinco años en el estadio I en más del 90% de los casos (Benedet JL 2003); en las pacientes con lesiones localmente avanzadas o metastásicas, se incrementa de manera significativa el riesgo de recurrencia y muerte por el Cacú; con decesos que ocurren a pesar de los protocolos de cirugía y radioterapia actuales, como resultado de una falla de los tratamientos (Im SS 2002).

En cuanto a la reincidencia, se calcula que aproximadamente el 35% de las mujeres diagnosticadas con Cacú recaen, dentro de las cuales el 90% de los casos ocurre en los siguientes 3 años después del tratamiento inicial (Pectasides D 2008). Estos datos argumentan las implicaciones clínicas que pueden presentarse en el Cacú durante estadios avanzados, por lo que diferentes propuestas se han hecho para explicar y abordar estas características clínicas. Una de estas propuestas es la presencia

de CTC, que pudieran explicar por ejemplo, la resistencia a fármacos dirigidos a las células cancerosas (Todaro M 2010) y a lo cual diversos estudios se han enfocado en esclarecer si en efecto, existen las CTC en el Cacú además de sus características. Es por esto que en el siguiente apartado se hace referencia a lo descrito de las CTC en el Cacú.

2.8.1 Las CTC en el Cáncer Cérvico-Uterino

La búsqueda de la existencia de las CTC en diferentes modelos de estudios ha llevado a un enorme esfuerzo para identificarlas y caracterizarlas en diferentes tipos de cáncer, dentro de los cuales el Cacú está incluido. Uno de los primeros estudios para identificar a las CTC en el Cacú, fue el realizado por el grupo de Taga Tetsuya, quien detectó la presencia de una subpoblación celular que expulsó el marcaje de ADN Hoechst 33342 en HeLa, una línea celular de Cacú (Kondo T 2004). A estas células con esta característica se les llama población lateral y es referida por algunos autores como CTC, lo que sugería que efectivamente, en el Cacú existen las CTC. Posteriormente, se demostró que una pequeña población celular proveniente de tumores de Cacú fue clonogénico, es decir capaz de proliferar a partir de células individuales *in vitro*, y fue capaz de iniciar tumores en trasplantes seriales *in vivo*, siendo ambas capacidades atribuidas a las CTC. De manera relevante, esta subpoblación celular expresó β -catenina (Hubbard SA 2009).

En otro estudio se observó que, en 8 de 19 muestras de pacientes con Cacú, se identificaron células con la capacidad de proliferar y formar esferas en presencia de factores de crecimiento como: bFGF, EGF, insulina, L-glutamina y B27, lo que sugirió la presencia de CTC. En este mismo estudio se detectaron células con un inmunofenotipo CD44⁺CK17⁺, que fueron quimioresistentes y tumorigénicos en un modelo de xenotrasplante, postulando no solo la presencia de CTC en el Cacú, sino a CD44 y CK17 como marcadores celulares de estas células. De manera interesante, en esta subpoblación celular observaron la expresión de genes como *c-myc* (Feng D 2009).

Adicionalmente, en un estudio más reciente que utilizó líneas celulares de Cacú, incluyendo a HeLa y SiHa, se observó que las células derivadas de esferas fueron más tumorigénicas que las células crecidas en monocapa, lo que sostiene que en las esferas se enriquecen las células tumorigénicas, posiblemente incluyendo a las CTC. Esto porque, al comparar los perfiles de expresión, se observó un incremento de transcritos en las esferas de HeLa y SiHa, relacionados a células troncales normales del sistema reproductor femenino, como: *cd44*, *itgb1* (*cd29*), *psca* y *nt5e* (*cd73*). Sin embargo, también se observaron diferencias entre HeLa y SiHa, ya que *pcgf4* (*bmi1*) y *abcg2* incrementó solo en HeLa mientras que *eng* (*cd105*) y *c-myc* solo en SiHa (López J 2012). La diferencia en los transcritos incrementados entre las células HeLa y SiHa en las esferas, puede deberse a las características biológicas intrínsecas de cada una de estas líneas celulares, incluyendo el tipo de VPH en cada una.

Respecto al último punto, es importante resaltar que la infección persistente con VPH es el principal requisito para el desarrollo del Cacú (Walboomers JM 1999), por lo que se han caracterizado alrededor de 150 genotipos de VPH, de los cuales 14 se consideran de alto riesgo. Los tipos VPH16 y VPH18 son de alto riesgo y son los más prevalentes en las biopsias del cáncer y se les atribuye el 50% y 20% de los casos de Cacú, respectivamente (Burd EM 2003). Por esta razón, el uso de las líneas celulares HeLa y SiHa como modelo experimental es de suma utilidad, pues HeLa posee el tipo VPH18 y SiHa el tipo VPH16, lo que permite estudiar de manera cercana los dos contextos celulares más comunes en el campo clínico, pero esto también implica que, puedan presentarse diferencias biológicas entre HeLa y SiHa, ya sea en estudios *in vitro* o *in vivo*. Un ejemplo de esto, es la diferencia en la morfología de las esferas que formaron las células HeLa respecto a las esferas que formaron las esferas SiHa, a pesar de que en ambas se enriquecieron a las CTC (Órtiz-Sánchez E 2016). En este mismo estudio

se propusieron a CK17, p63, ANEXINA II, CD49f y la alta actividad de ALDH como marcadores celulares de las CTC en el Cacú. En particular, y de manera relevante para nuestro trabajo, observaron que las células ALDH^{ALTO} fueron más tumorigénicas que las células ALDH^{BAJO} y que las células sin algún inmunofenotipo específico, aunque todas provinieron de esferas.

Es importante considerar que, aunque haya evidencia acerca de las CTC en el Cacú, el mecanismo molecular que da origen al Cacú tras la infección con VPH aún continúa bajo estudio, pero lo que sí se conoce es que VPH afecta la expresión del gen *c-myc*, clave en la tumorigénesis (Walboomers Jm 1999; Garland S 2007). Este efecto sobre el gen *c-myc* puede ser directa por la integración de secuencias del genoma viral en el genoma celular o indirecta a través de la vía WNT/ β -catenina para lo cual, ya se describe que proteínas del VPH interaccionan con ciertos componentes de esta vía, enfatizando así, la importancia de esta vía en el Cacú (Durst M 1987; Bello JO 2015). Bajo esta idea, diversos estudios se han enfocado en establecer si existe una relación entre el desarrollo del Cacú y el nivel de activación de la vía WNT/ β -catenina, por lo que en el siguiente apartado se describen parte de los reportes que se han hecho en este rubro.

2.8.2 Alteraciones de la vía WNT/ β -catenina en el Cáncer Cérvico-Uterino

Diversas vías de señalización cambian en las células cancerosas, pero esto no necesariamente implica que cada una de ellas participe en el inicio, desarrollo y/o reincidencia del cáncer. Respecto a la vía WNT/ β -catenina, se ha buscado si cambios en esta vía son relevantes para el progreso del Cacú.

Uno de las estrategias para conocer cambios en la vía WNT/ β -catenina en el Cacú fue justo hallar la presencia de los ligandos WNT bajo este contexto celular. Uno de los primeros descritos fue el ligando WNT14, cuya sobre-expresión del transcrito se observó en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, incluyendo al Cacú y particularmente en células HeLa (Kirikoshi H 2001). Más adelante se detectó que también en HeLa se sobre-expresa el transcrito de WNT10B (Kirikoshi H 2002) y a pesar de que el tipo de VPH pudiera influir en el perfil de miembros de WNT relevantes en cada caso, como lo sugirió la presencia de los transcritos de WNT4 y WNT8A en muestras de Cacú con VPH16, esto no se ha demostrado aún (Perez-Plasencia C 2007).

Es importante mencionar que no solo la presencia de los ligandos WNT toma relevancia, sino cambios en sus niveles. Esto por lo descrito para WNT11, cuya intensidad y número de células aumenta en tejidos de Cacú en comparación a SIL o tejidos de cérvix normal. Y no solo esto, sino que se ha propuesto una correlación entre los niveles de WNT11 y el estadio FIGO del Cacú, la metástasis a nódulos linfáticos o el tamaño del tumor, proponiéndolo incluso como un indicador de la progresión del Cacú (Wei H 2014; Wei H 2016). Esto también parece ocurrir con otros ligandos como WNT5A, cuya sobre-expresión proteica en muestras de pacientes con Cacú en comparación al tejido cervical normal lo llevo a asociársele con la supervivencia y con la supervivencia libre de recaída en los pacientes (Lin L 2014).

Los estudios además han propuesto la posible repercusión funcional que pudieran tener los ligandos WNT en el desarrollo del Cacú. Un ejemplo de esto es el ligando WNT7A, cuyos niveles bajos del transcrito se detectaron en líneas celulares y biopsias derivadas de Cacú, pero tras su re-expresión en líneas celulares se logró disminuir la viabilidad, la proliferación y la migración de estas células; sugiriendo que su función en efecto podría ser relevante (Ramos-Solano M 2015). Además de este antecedente, propiedades como supresor de tumores se le atribuyen a WNT7A, por identificarse una hipermetilación en las islas CpG de su promotor en células cancerosas (Yang M 2018). De manera interesante, esta modificación epigenética también se describe en células HeLa y SiHa, líneas celulares empleadas en el presente trabajo, lo que lleva a pensar que cambios epigenéticos en las

células de Cacú podrían tener implicaciones clínicas y no solo cambios genéticos (Ramos-Solano M 2015).

Por otro lado respecto a β -catenina, los primeros estudios reportaron que su transcrito aumentó en muestras de carcinoma cervical (Shim C 1998). Sin embargo, al analizar a nivel de proteína, otro estudio detectó que β -catenina disminuyó con la progresión de las lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) (De Boer CJ 1999). Más adelante y acorde a este último, se descubrió que la proteína β -catenina no se detectó en el 58% de los carcinomas cervicales invasivos y en el 40% de los carcinomas cervicales in situ (CIS), pero sí en la mayoría de las muestras de tejido cervical normal, por lo que relacionaron la ausencia de β -catenina con la tumorigénesis cervical y la invasividad. Sin embargo, esto no fue concluyente pues, 11 de 26 muestras mostraron niveles normales (Moon HS 2003).

Más recientemente, se describió que una baja supervivencia de las pacientes con Cacú correlaciona con bajos niveles de proteína de β -catenina y de β -catenina fosforilada en el residuo Y654, modificación postraducciona que favorece su translocación al núcleo (Chakraborty C 2017). Esto lleva a pensar que, no solo la presencia o ausencia de β -catenina es importante para sugerir si la vía WNT está activa o no, sino también su relocalización subcelular. Bajo este aspecto, se detectó que en carcinomas de células escamosas (SCC), β -catenina membranar fue baja en el 72% y alta en el 28% en los tumores analizados, por lo se concluyó que cambios en la localización de β -catenina pudieran ser de significancia en el pronóstico (Van de Putte G 2004).

Además, el grupo de Fujimori mostró que β -catenina se localizó en la membrana en el epitelio cervical normal, pero en el 65% de los tumores analizados tuvo un patrón anormal ya sea reduciéndose o relocalizándose en el citoplasma y/o el núcleo. Mediante un análisis estadístico, los autores señalaron que mantener el patrón de localización subcelular de β -catenina es un factor de pronóstico favorable y que cambios en esta localización se asocia a la progresión de los adenocarcinomas cervicales a un fenotipo invasivo (Imura J 2001). Otros reportes concuerdan que, la relocalización subcelular de β -catenina se relaciona con el avance de las SIL pero no en carcinomas invasivos, sugiriendo que esta relocalización solo se da durante la neoplasia intraepitelial escamosa (Shinohara A 2001).

También, se ha estudiado si esta relocalización subcelular de β -catenina se asocia a un tipo histológico en particular del Cacú. En un estudio, se reportó la relocalización citoplasmática de β -catenina en 28 de 31 muestras de carcinomas adenoescamosos, en 23 de 27 muestras de adenocarcinomas y en 52 de 68 muestras de carcinomas escamosos, lo que significó una proporción similar entre estos tipos histológicos. Además se señaló que, a pesar de una localización aberrante de β -catenina, se continuó detectando en la membrana e incluso en el núcleo para algunos casos, por lo que los autores concluyeron que la translocación nuclear no necesariamente se asocia a un potencial maligno (Rodríguez-Sastre MA 2005). En el mismo año, pero en otro estudio, también se analizó β -catenina en cuanto a sus niveles de proteína, localización subcelular y su posible asociación a un tipo histológico en particular. A partir de éste, se demostró que la pérdida en la expresión de β -catenina fue un evento frecuente en los carcinomas cervicales de estadio temprano, sin importar el subtipo histológico. Esto apuntó a que, β -catenina participa en el Cacú, aunque sin correlacionarse a un subtipo histológico en particular. Más aun, esta pérdida en la expresión de β -catenina no fue significativa, al menos en el estadio temprano FIGO 1A y 1B, para el pronóstico, la supervivencia libre de recurrencia, la sobrevivencia promedio, la frecuencia en la invasión linfovascular, el grado histológico y la frecuencia de afectación a ganglios linfáticos (Fadare O 2005). Esta falta de correlación entre la deslocalización de β -catenina con parámetros clínicos en algunos estudios, puede deberse a que existe una gran diversidad en las características del Cacú entre las pacientes, ya que por ejemplo, se detectó una deslocalización de β -catenina solo en 26 de 43 muestras de carcinomas de células escamosas

cervicales, evidenciando esta heterogeneidad inter-tumoral, pese a que fueron pocos los casos analizados (Jing J 2014).

Si bien, una de las causas para esta relocalización de β -catenina puede darse por mutaciones en la misma proteína, parece que esto no sucede en la mayoría de casos del Cacú. Esto porque, al analizar muestras de pacientes, 12 de 20 mostraron una acumulación de β -catenina en el núcleo pero solo en 2 casos se detectaron mutaciones en el gen *ctnnb1* (que codifica para β -catenina) (Ashihara K 2002). Esto sugiere que, mecanismos adicionales promueven cambios ya sea en los niveles de proteína de β -catenina o en su localización subcelular. Estos mecanismos pueden involucrar a otros componentes de la vía WNT/ β -catenina. Por ejemplo, se reporta la hipermetilación y disminución de la expresión de genes como: *dkk3* (Lee EJ 2009), *wif1* (Ramachandran I 2012), *sfrp1*, *sfrp2* y *sfrp4* (Chung MT 2009) en muestras de tumores cervicales, los cuales actúan como reguladores negativos de la vía WNT/ β -catenina y que, de acuerdo a esto, se desencadenaría la sobre-activación de esta vía. Estos datos también pueden tener una relevancia clínica ya que la presencia de SFRP's reprimió la metástasis y la invasión de las células de cáncer cervical (Chung MT 2009). Incluso, los niveles de proteína de GSK3 β , regulador negativo directo de β -catenina, son altos en los tejidos cervicales normales, pero bajos en lesiones precancerosas y cancerosas (Rath G 2015).

Con estos antecedentes, se vuelve notorio que, a pesar de que diversos reportes han buscado establecer si existe o no una relación entre la vía WNT/ β -catenina y el desarrollo del Cacú, no se ha logrado llegar a una clara evidencia que así lo demuestre. Es posible que esta relación no sea evidente al ser influenciada por un tercer factor, como lo es la subpoblación celular de CTC, que puede cambiar su porcentaje entre los tumores, y así impactar de manera diferente en las características biológicas de cada tumor. Por esta razón, el presente trabajo se enfoca en analizar si el estado de activación de la vía WNT/ β -catenina en un cultivo celular depende del porcentaje de CTC, o viceversa, es decir, si el porcentaje de CTC depende del estado de activación de la vía WNT/ β -catenina. Para esto, se usaron las líneas celulares derivadas de Cacú: HeLa y SiHa, las cuales presentan un bajo porcentaje de CTC en cultivo de monocapa, pero un mayor porcentaje en cultivo de esfera, para que al evaluar la vía WNT/ β -catenina en ambas condiciones permita saber si en efecto existe una relación entre esta vía y las CTC.

3. HIPÓTESIS

Dado que la vía WNT/ β -catenina participa en el mantenimiento y enriquecimiento de las CTC en diferentes tipos de cáncer, el porcentaje de las CTC se relacionará directamente con un incremento o un decremento en la activación de esta vía en el Cacú.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre el estado de activación de la vía WNT/ β -catenina y los porcentajes de CTC en dos líneas celulares de Cacú: HeLa y SiHa.

4.1 Objetivos específicos

- 1.** Analizar la vía WNT/ β -catenina en un cultivo en monocapa (menor porcentaje de CTC) de HeLa y SiHa.
- 2.** Analizar la vía WNT/ β -catenina en un cultivo de esferas (mayor porcentaje de CTC) de HeLa y SiHa, y compararlo con un cultivo en monocapa.
- 3.** Activar o inhibir la vía WNT/ β -catenina, en cultivo de monocapa o cultivo de esfera, y medir los porcentajes de CTC de HeLa y SiHa.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la figura 4 se muestra el diseño experimental del presente trabajo.

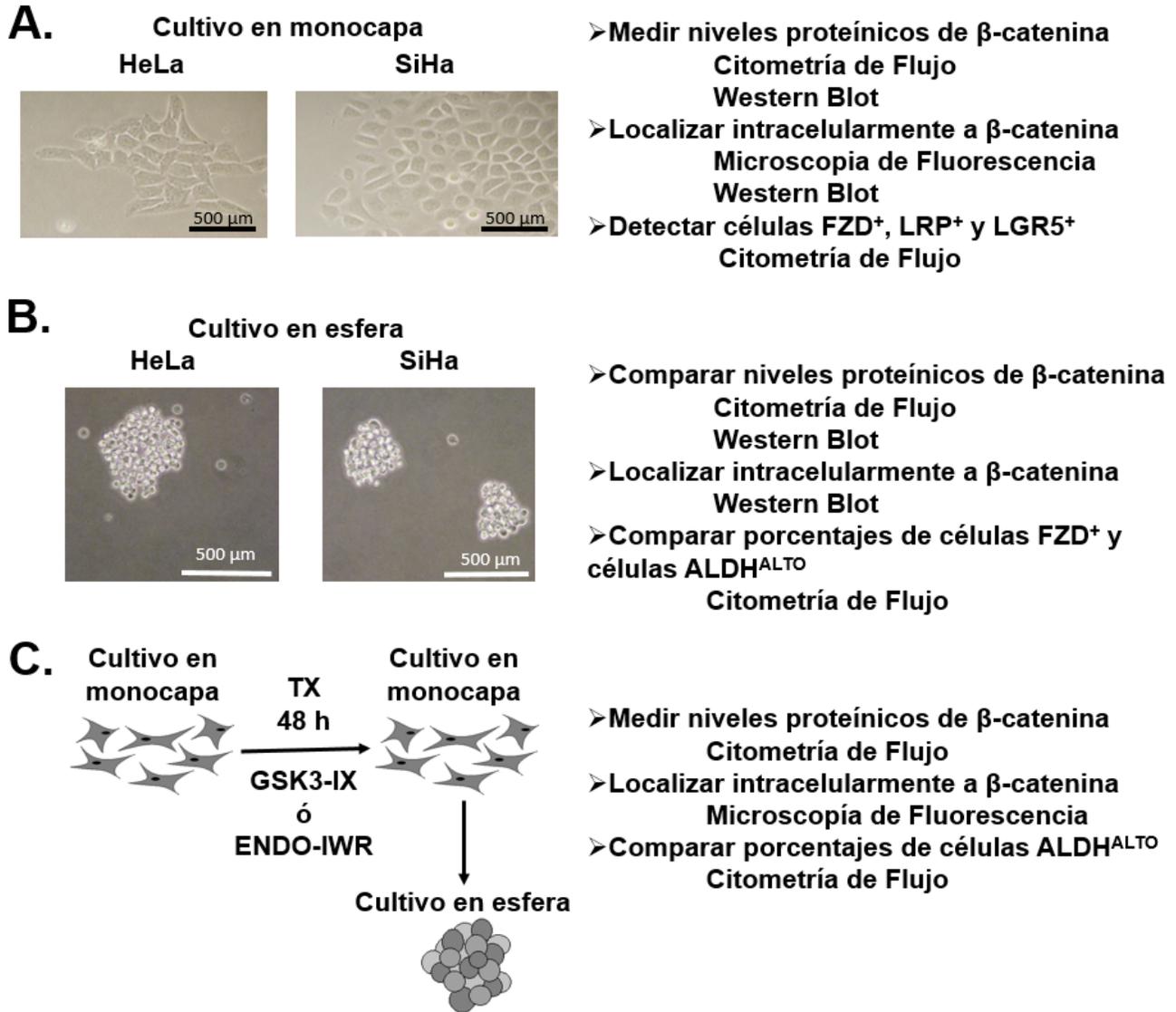


Figura 4. Diseño experimental. Se muestra la estrategia experimental para analizar la vía WNT/ β -catenina en células HeLa y SiHa en cultivos de monocapa (A) y cultivos de esferas (B). Para evaluar el papel de la vía WNT/ β -catenina en los porcentajes de células ALDH^{ALTO}, se realizó el tratamiento (TX) con GSK3-IX ó ENDO-IWR, activador e inhibidor respectivamente, durante 48 en un cultivo en monocapa. Se cuantificaron las células ALDH^{ALTO} en cultivo de monocapa y cultivo de esfera de células tratadas (C).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

6.1.1 Cultivo celular en monocapa

Las líneas celulares de Cáncer Cérvico-Uterino: HeLa (adenocarcinoma VPH18) y SiHa (carcinoma de células escamosas VPH16) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). La línea celular AGS (adenocarcinoma gástrico) se cultivó en medio DMEM: Ham's F12 en una proporción 1:1. La línea celular Kato III (carcinoma gástrico) se cultivó en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium). Los medios de cultivo se suplementaron con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10% (v/v) y antibiótico al 1% de Hyclone (100 U/ml Penicilina G, 100 µg/ml Estreptomicina y 25 µg/ml Anfotericina B, Thermo Fisher Scientific). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

La cosecha de las células se realizó retirando el medio de cultivo, haciendo 1 lavado con PBS 1X e incubando con PBS 1X: Verseno (EDTA al 0.025%) en una proporción 1:1, durante 7 min a 37°C. Al término de la incubación, las células se suspendieron mecánicamente por pipeteo y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se suspendieron en PBS 1X para su posterior manipulación.

6.1.1.2 Activación o inhibición de la vía WNT/ β -catenina

Los cultivos en monocapa con una confluencia de 60-70%, se les retiró el medio de cultivo, se hizo 1 lavado con PBS 1X y se agregó el medio de cultivo adicionado con los respectivos compuestos que alteran la vía WNT/ β -catenina: el compuesto GSK-3 Inhibitor IX-CAS 667463-62-9 (No. de cat. 361550, Calbiochem) que favorece la estabilización de β -catenina y activa la vía, o el compuesto IWR-1-endo (sc295215, Santa Cruz Biotechnology) que promueve la desestabilización de β -catenina e inhibe la vía. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

6.1.2 Cultivo celular de esferas

Las células se crecieron previamente en un cultivo celular en monocapa hasta alcanzar una confluencia de 80-90%. Las células se cosecharon y se contaron usando la cámara de Neubauer. Las células se sembraron a una densidad celular de 9,000 células/ml en medio Mammocult™ Medium (No. de cat. 05621, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) suplementado con Mammocult™ Proliferation Supplement (Human) al 10% (No. de cat. 05622, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) en placas de ultra-baja adherencia (Corning, Inc., Corning NY, USA). El medio de cultivo de esferas para HeLa fue suplementado con 0.48 µg/ml de hidrocortisona y 4 µg/ml de heparina. El medio de cultivo de esferas para SiHa fue suplementado con 4 µg/ml de heparina. Las células se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad y se analizaron a las 72 h.

Al término del cultivo de esferas, el medio de cultivo con las esferas se colectó en tubos de 15 ml. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y las esferas se suspendieron en PBS 1X. Para disgregar las esferas en células individuales, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se suspendieron en PBS 1X: Verseno (EDTA al 0.025%) en una proporción 1:1. Se incubaron durante 5 min a 37°C y al término se disgregaron mecánicamente por pipeteo y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se suspendieron en PBS 1X para su posterior manipulación.

6.2 Citometría de Flujo

6.2.1 Marcaje de proteínas

A partir de células contadas en suspensión en PBS 1X, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C y se suspendieron 5×10^5 células en 300 μ l de Amortiguador de Flujo (0.5% BSA, 2 mM EDTA, PBS 1X) con el correspondiente anticuerpo primario. La dilución fue: 1:200 para anti-human/mouse beta-catenin (14-2567-82, eBioscience), 1:200 para anti-Non-Phospho-beta-catenin (Ser33/37/Thr41) (D13A1) (Rabbit mAb #8814, Cell Signaling Technology), 1:100 para anti-c-Myc (2Q330) (sc-70461, Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1:100 para anti-FZD (sc9169, Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1:100 para anti-LGR5-PE human (No. de cat. 130-100-848, Miltenyi Biotec), 1:100 para anti-FZD7 (sc293261, Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1:100 para anti-LRP6 [EPR2423(2)] (GTX 62901, GeneTex) y 1:100 para anti-p-GSK-3 α /beta (Tyr279/216) (sc-135653, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La incubación con el anticuerpo primario fue a 4°C durante 30 min.

Al término de la incubación, las células se centrifugaron a 2200 rpm durante 5 min a 4°C y se suspendieron en 300 μ l de Amortiguador de Flujo con el correspondiente anticuerpo secundario. La dilución fue: 1:600 para Goat anti-Rabbit IgG Fc (Alexa Fluor® 594; ab150092 Abcam), 1:600 para Fluorescein Goat anti-Rabbit IgG Antibody (No. de cat. FI-1000, Vector Laboratories), 1:800 para Fluorescein Horse anti-Mouse IgG Antibody (No. de cat. FI-2000, Vector Laboratories) y 1:800 para Goat anti-mouse IgG Antibody (Alexa Fluor®647, BioLegend). La incubación con el anticuerpo secundario fue a 4°C durante 30 min en oscuridad.

Al término de la incubación, las células se centrifugaron a 2200 rpm durante 5 min a 4°C y se suspendieron en 300 μ l de Amortiguador de Flujo para su análisis en el citómetro BD FACSCalibur con un mínimo de 10,000 eventos registrados. Para el caso de los dobles marcajes, se realizó cada marcaje de manera secuencial siguiendo el mismo protocolo.

6.2.2 Medición de la actividad de ALDH

La actividad de ALDH se evaluó usando el kit® ALDEFLUOR (Stem Cell Technologies). Las células se cosecharon, lavaron, contaron y suspendieron a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en el amortiguador ALDEFLUOR. Para 1×10^6 células, se adicionó 2.5 μ M del sustrato de ALDEFLUOR e inmediatamente se tomó la mitad de volumen para adicionarle 2.5 μ M de DEAB, inhibidor de ALDH (control negativo). Ambas condiciones se incubaron durante 45 min a 37° C en oscuridad. Al término de la incubación, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se suspendieron en 300 μ l del amortiguador ALDEFLUOR. El análisis se adquirió en el citómetro BD FACSCalibur con un mínimo de 10,000 eventos registrados. Para el caso del doble marcaje, primero se realizó el marcaje de proteína y después la medición de la actividad de ALDH, acorde al protocolo de cada uno.

6.3 Separación y extracción de proteínas en fracciones nucleares y fracciones citoplasmáticas/membranales

El fraccionamiento subcelular para la extracción proteínica se realizó de acuerdo al protocolo descrito para el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (No. de cat. 78835, Thermo Scientific) y que se describe brevemente. Las células se cosecharon, lavaron y contaron. 1×10^6 células se suspendieron en 100 μ l de CER I y se agitaron vigorosamente durante 15 s. Se incubó en hielo durante 10 min y se adicionó 5.5 μ l de CER II. Se agitó vigorosamente 5 s y se incubó durante 1

min en hielo. Al término se agitó vigorosamente 5 s y se centrifugó a 13 500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante (fracción citoplasmática/membranal) se recuperó y se guardó a -70°C. La fracción insoluble se lavó adicionando 100 µl de CER 1, agitando vigorosamente durante 15 s y centrifugando a 13 500 rpm durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la fracción insoluble se suspendió en 50 µl de NER I.

Se agitó vigorosamente durante 15 s cada 10 min a lo largo de 2 horas, manteniéndolo a 4°C. Al término, se centrifugó a 13 500 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante (fracción nuclear) se recuperó y se guardó a -70°C.

Los reactivos CER I y NER I fueron complementados con 1X de Inhibidor de Proteasas (Protease Inhibitor Cocktail 100X Cell Signaling Technology #5871S) y 1X de Inhibidor de Fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X Cell Signaling Technology #5870).

6.4 Western Blot

La concentración de proteína se determinó usando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (No. de cat. 23227, Thermo Fisher Scientific). Para la electroforesis, se cargaron 40 µg de cada muestra en geles al 10% de acrilamida y se corrieron a 100 V. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA, USA). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente por 1 hora con TBS/Tween/Leche (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween-20 al 0.05% v/v, 5% de leche).

Al término del bloqueo, las membranas se incubaron en TBS-Tween-Leche con el correspondiente anticuerpo primario. La dilución fue 1:2000 para anti-human/mouse beta-catenin (14-2567-82, eBioscience), 1:2000 para anti-Non-Phospho-beta-catenin (Ser33/37/Thr41) (D13A1) (Rabbit mAb #8814, Cell Signaling Technology), 1:250 para anti-c-Myc (2Q330) (sc-70461, Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1:2000 para anti-p-GSK-3alfa/beta (Tyr279/216) (sc-135653, Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1: 5000 para anti-GAPDH (sc-48167, Santa Cruz Biotechnologies, Inc), 1:3000 para anti-Actina (sc-1616, Santa Cruz Biotechnologies, Inc) y 1:1000 para anti-Lamin A/C (sc6215, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La incubación con el anticuerpo primario fue de 12 h a 4°C en agitación suave.

Al término de la incubación, se realizaron tres lavados con TBS/Tween (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween-20 al 0.05% v/v) de 10 min cada uno en agitación moderada.

Posteriormente, las membranas se incubaron en TBS/Tween/Leche con el correspondiente anticuerpo secundario. La dilución fue 1:10000 para Donkey anti-Goat IgG-HRP (sc-2020, Santa Cruz Biotechnologies, Inc), 1: 5000 para Donkey anti-Rabbit IgG-HRP (sc-2313, Santa Cruz Biotechnologies, Inc) y 1: 5000 para Goat anti-Mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnologies, Inc). La incubación con el anticuerpo secundario fue de 2 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Al término de la incubación, se realizaron dos lavados con TBS/Tween y un lavado con TBS 1X. Cada lavado fue de 10 min con agitación moderada.

El revelado se hizo incubando la membrana con el sustrato Immobilon quimoluminiscente de HRP para transferencias Western (No. de cat. WBKLS0500, EMD Millipore) y la detección fue a través del equipo Li-COR (Biosciences). La cuantificación se realizó por el análisis densitométrico de las imágenes empleando el software ImageJ®.

6.5 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en portaobjetos para inmunofluorescencia. Al alcanzar el 80-90% de confluencia, se fijaron con Paraformaldehído al 4% durante 5 min y se hicieron 3 lavados con PBS 1X y 3 lavados con PBS 1X/BSA al 0.1%. Cada lavado fue con agitación suave durante 5 min.

Las células se permeabilizaron y bloquearon con la Solución de Bloqueo (PBS 1X/Tritón X-100 al 0.3%/SFB al 10%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el portaobjetos se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X/BSA al 0.1%/SFB al 10%. La dilución fue 1:100 para anti-human/mouse beta-catenin (14-2567-82 eBioscience). La incubación con el anticuerpo primario fue durante 12h a 4°C en cámara húmeda.

Al término de la incubación, se realizaron tres lavados con PBS1X/SFB al 10% durante 10 min cada uno con agitación suave. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PBS 1X /BSA al 0.1% /SFB al 10%. La dilución fue 1:200 para Fluorescein Horse anti-Mouse IgG Antibody (No. de cat. FI-2000, Vector Laboratories Inc). Los núcleos se tiñeron incubando el portaobjetos en una solución de 0.5 µM de IP durante 5 min a temperatura ambiente. Las imágenes se capturaron en el Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM.

6.6 Viabilidad celular y citotoxicidad

6.6.1 Ensayo de MTT

Se sembraron 5,000 células por cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad. Al término, se cambió el medio de cultivo con medio de cultivo adicionado con GSK-3 Inhibitor IX-CAS 667463-62-9 (No. de cat. 361550, Calbiochem) o con IWR-1-endo (sc295215, Santa Cruz Biotechnology) a cada una de las concentraciones indicadas. Las células se incubaron durante 48 h nuevamente a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

Al término de la incubación, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. Después, se adicionó medio de cultivo con MTT (0.5 µg/µl) y se incubó a 37°C durante 2 horas o hasta que los cristales de formazan fueran visibles en el microscopio. Una vez formados los cristales, se retiró el medio de cultivo y se adicionó la Solución de Solubilización (0.04 M HCl en isopropanol absoluto). Se realizó una incubación adicional a temperatura ambiente durante 15 min en agitación moderada.

Al término de la incubación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectofotómetro.

6.6.2 Tinción por Azul de Tripano

Se sembraron 100,000 células en placas de cultivo de 60 mm y se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad. Al alcanzar la confluencia de 60-70%, se les retiró el medio de cultivo, se hizo 1 lavado con PBS 1X y se adicionó el medio de cultivo adicionado con las concentraciones indicadas de GSK-3 Inhibitor IX-CAS 667463-62-9 (No. de cat. 361550, Calbiochem) o de IWR-1-endo (sc295215, Santa Cruz Biotechnology). Las células se incubaron durante 48 h nuevamente a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

Al término de la incubación, las células se cosecharon y se lavaron con PBS 1X. Se suspendieron en PBS 1X y se diluyó 1:1 (v:v) la suspensión celular con el reactivo de Azul de Tripano. Se contaron las células utilizando la cámara de Neubauer y se calculó el porcentaje de células muertas utilizando la Ecuación A.

$$\text{Ecuación A: } \textit{Porcentaje de células muertas} = \frac{\# \textit{ de células teñidas}}{\# \textit{ de células totales}} \times 100.$$

6.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) con significancia al 5%. Los valores de p se calcularon por la prueba t de Student, con corrección de Welch para $n \geq 4$. La n se menciona al pie de figura de cada experimento y en el texto. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los resultados se representan como la media \pm Desviación estándar (DE).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de la Vía WNT/ β -catenina en cultivos en monocapa de células HeLa y SiHa

La vía WNT/ β -catenina es una de las vías de señalización que no solo se asocia al cáncer, sino en particular a las CTC, por lo que se analizaron los niveles de β -catenina, proteína clave en este mecanismo molecular, en células HeLa y SiHa a través de citometría de flujo en cultivos de monocapa. El análisis mostró que la mayoría de las células tienen β -catenina, con el $95.9\% \pm 1.2\%$ de las células HeLa siendo β -catenina⁺, mientras que en las células SiHa fue de $81.6\% \pm 5.5\%$, y aunque esta diferencia entre HeLa y SiHa fue estadísticamente significativa, los porcentajes fueron similares ($n=9$; $p \leq 0.05$) (Fig. 5A, B). De manera interesante, en las células SiHa se detectaron dos subpoblaciones celulares, es decir que expresaron diferentes niveles de β -catenina (alto y bajo), opuesto a las células HeLa, donde las células β -catenina⁺ mostraron niveles similares (Fig. 5C). Además, la fluorescencia en relación a β -catenina fue mayor en las células HeLa (19.85 ± 3.45 URF) que en las células SiHa (15.01 ± 2.75 URF), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($n=15$; $p \leq 0.05$), lo que significó que la cantidad de β -catenina total en las células positivas es similar entre HeLa y SiHa (Fig. 5D).

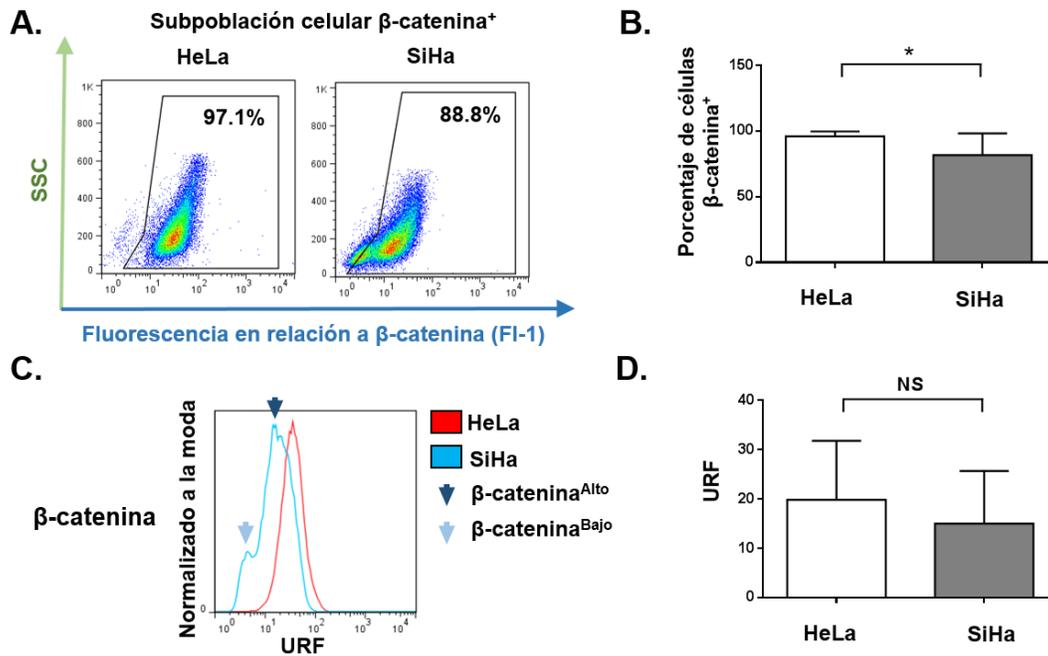


Figura 5. Las células HeLa y SiHa son β -catenina⁺ en cultivos en monocapa. **A.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra β -catenina. Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. **B.** Cuantificación de los porcentajes de las células β -catenina⁺ en HeLa y SiHa (n=9). **C.** Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo en células HeLa (rojo) y SiHa (azul) teñidas contra β -catenina. Las flechas señalan los picos de las subpoblaciones celulares en SiHa. **D.** Cuantificación de las URF en relación a β -catenina en HeLa y SiHa (n=15). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los niveles de β -catenina entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$. NS representa diferencia no significativa.

Una vez que se identificó que las células HeLa y SiHa expresan β -catenina, lo importante fue conocer su localización dentro de las células, lo cual se relaciona con su función. Para ello, se analizó la localización subcelular de β -catenina por microscopía de fluorescencia, particularmente en el núcleo, dado que la activación de la vía WNT/ β -catenina implica la translocación de β -catenina al núcleo. Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS como control positivo de localización nuclear de β -catenina, porque una sobre-activación de la vía WNT/ β -catenina se observa en estas células, incluyendo β -catenina en el núcleo de manera constitutiva (Kim SM 2005).

Las imágenes muestran que β -catenina se localizó en el citoplasma y en la membrana de las células HeLa y SiHa en cultivo de monocapa. De manera interesante, en las células SiHa fue evidente la presencia de células con mayores niveles de β -catenina (Fig. 6A) lo que se relaciona con el análisis de citometría de flujo, donde se identificaron dos subpoblaciones celulares con diferentes niveles de β -catenina. Dado que no fue evidente si β -catenina estaba en el núcleo en las células HeLa y SiHa, se procedió a un análisis por microscopía confocal. Este análisis evidenció que β -catenina se localiza en el núcleo de las células HeLa, aunque se continuó detectando mayoritariamente en el citoplasma (Fig. 6B). Para corroborar que β -catenina se localiza en el núcleo, se realizó un fraccionamiento subcelular para extraer y separar proteínas en el núcleo de las proteínas en el citoplasma o membrana. El análisis por Western Blot detectó a β -catenina en ambas fracciones, confirmando que β -catenina se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma o membrana de células HeLa y SiHa (Fig. 6C). Además se

observaron cambios en el peso molecular de β -catenina entre las fracciones subcelulares, posiblemente por cambios postraduccionales en esta proteína, sin embargo esto ya no se demostró.

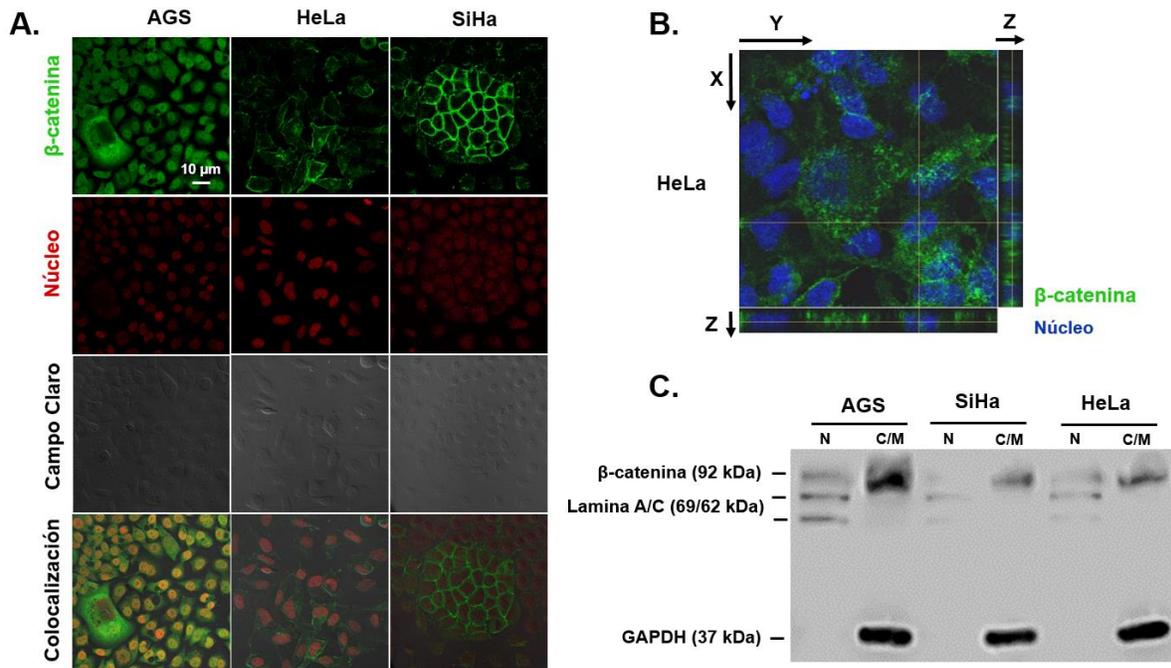


Figura 6. β -catenina se localiza en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células HeLa y SiHa en cultivos en monocapa. **A.** Imágenes representativas por microscopía de fluorescencia de las líneas celulares: AGS (control positivo), HeLa y SiHa con tinción para β -catenina (verde), tinción nuclear con IP (rojo) y campo claro. Magnificación=40X. Escala de la barra: 10 μ m. **B.** Imagen representativa de microscopía confocal de células HeLa con tinción para β -catenina (verde), tinción nuclear con DAPI (azul). **C.** Western Blot del fraccionamiento subcelular de cultivos de AGS, HeLa y SiHa. Lamina A/C: Control de carga de N (fracción nuclear). GAPDH: Control de carga de C/M (fracción citoplasmática/membranal).

Los niveles de β -catenina en la fracción citoplasmática/membranal se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con GAPDH como control de carga. Tras el análisis para comparar HeLa y SiHa (Fig. 7A) se observó que no hubo diferencia significativa entre ambas (0.85 ± 0.09 y 0.97 ± 0.18 para HeLa y SiHa, respectivamente; $n=7$; $p \leq 0.05$). Sin embargo, es importante considerar que el tipo de fraccionamiento realizado, no permite diferenciar los niveles de β -catenina en la membrana respecto al citoplasma, lo cual puede resultar relevante dado que las imágenes por microscopía de fluorescencia mostraron que, una subpoblación de células SiHa estuvo enriquecida de β -catenina membranal, a diferencia de las células HeLa, donde esto no fue evidente (Fig. 6A).

Posteriormente, y como referencia al estado de activación de la vía WNT/ β -catenina, se compararon los niveles de β -catenina en la fracción nuclear, pero en este caso se normalizaron con Lamina A y C como control de carga, ya que son proteínas estructurales del núcleo y por tanto también se utilizaron como control del fraccionamiento subcelular. El análisis estadístico señaló que no hubo diferencia significativa entre ambas líneas celulares (1.74 ± 0.39 para HeLa y 1.72 ± 0.17 para SiHa; $n=9$; $p \leq 0.05$), lo que mostró que los niveles de β -catenina nuclear fueron similares, además de sugerir una activación basal de la vía Wnt/ β -catenina en HeLa y SiHa (Fig. 7B).

Tras revelar que β -catenina se localizó en el núcleo, se evaluó β -catenina no fosforilada en los residuos S37 y T41, ya que si en efecto hay una activación basal de la vía WNT/ β -catenina en HeLa y SiHa,

estos residuos deberían dejar de estar fosforilados, ya que al fosforilarse llevan a la degradación de β -catenina. Esta forma de β -catenina no fosforilada es referida en el presente trabajo como ABC (por las siglas en inglés *Active- β -Catenin*). El análisis por Western Blot de la fracción citoplasmática/membranal detectó ABC, lo que sugirió que β -catenina se estabiliza en el citoplasma de células HeLa y SiHa, y tras normalizar, estos niveles fueron similares entre ambos tipos de células (0.80 ± 0.09 para HeLa y 0.57 ± 0.15 para SiHa; $n=17$; $p \leq 0.05$) (Fig. 7C). Para el caso de la fracción nuclear también se detectó ABC, lo que señaló que β -catenina no solo se estabiliza en el citoplasma sino que también transloca al núcleo, siendo similares los niveles nucleares normalizados de ABC entre las células HeLa y SiHa (0.47 ± 0.2 y 0.8 ± 0.24 , respectivamente; $n=7$; $p \leq 0.05$). Estos datos sugieren un estado de activación basal de la vía WNT/ β -catenina en ambas líneas celulares (Fig. 7D).

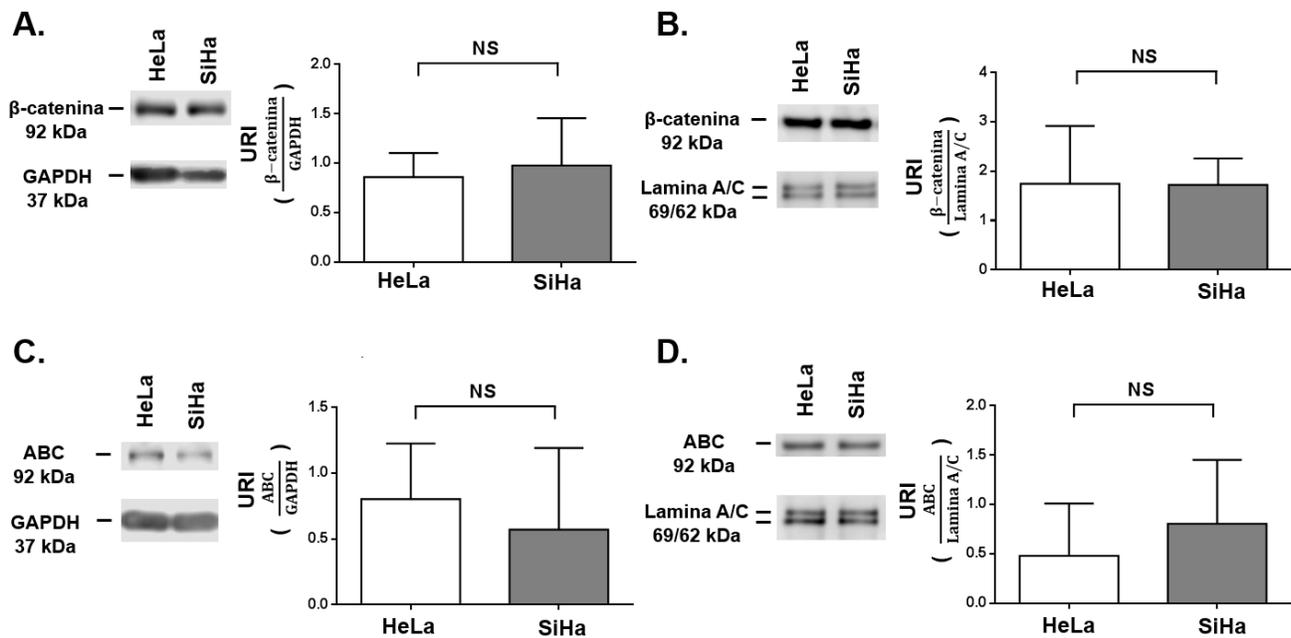


Figura 7. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) se localiza en las fracciones citoplasmática/membranal y nuclear de células HeLa y SiHa en cultivos en monocapa. A. Western Blot representativo de β -catenina en la fracción citoplasmática/membranal (panel izquierdo) y cuantificación de la densitometría ($n=7$) (panel derecho). **B.** Western Blot representativo de β -catenina en la fracción nuclear (panel izquierdo) y cuantificación de la densitometría (panel derecho) ($n=9$). **C.** Western Blot representativo de ABC en la fracción citoplasmática/membranal (panel izquierdo) y cuantificación de la densitometría (panel derecho) ($n=17$). **D.** Western Blot representativo de ABC en la fracción nuclear (panel izquierdo) y cuantificación de la densitometría (panel derecho) ($n=7$). El análisis densitométrico se normalizó con GAPDH para la fracción citoplasmática/membranal y con Lamina A/C para la fracción nuclear. URI: Unidades Relativas de Intensidad. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los niveles de β -catenina y ABC entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

Una vez detectado ABC en las fracciones subcelulares, se realizó el análisis por citometría de flujo para evaluar los niveles totales de ABC en células individuales de HeLa o SiHa. Los resultados mostraron que la mayoría de las células fueron positivas para ABC, con un $92.53\% \pm 2.59\%$ en HeLa y un $95.79\% \pm 0.79\%$ en SiHa, sin diferencia significativa entre ambas líneas celulares ($n=9$; $p \leq 0.05$) (Fig. 8B). De manera interesante, se observó en las células SiHa, la existencia de dos subpoblaciones celulares con base a sus niveles de ABC (ABC^{alto} y ABC^{bajo}), característica que no se observó en las

células HeLa, las cuales mostraron niveles similares de ABC (Fig. 8A). Con estos resultados se evidenció que al menos en SiHa, las células presentan diferentes niveles de β -catenina y ABC, lo que hace relación con una heterogeneidad intra-tumoral.

Al comparar la fluorescencia en relación a ABC, las células SiHa mostraron mayores niveles que las células HeLa, que por el análisis estadístico mostró ser significativo, aunque la desviación estándar no hace evidente esta diferencia (9.76 ± 0.90 URF para HeLa y 15.06 ± 1.51 URF para SiHa; $n=18$; $p \leq 0.05$) (Fig. 8C, D).

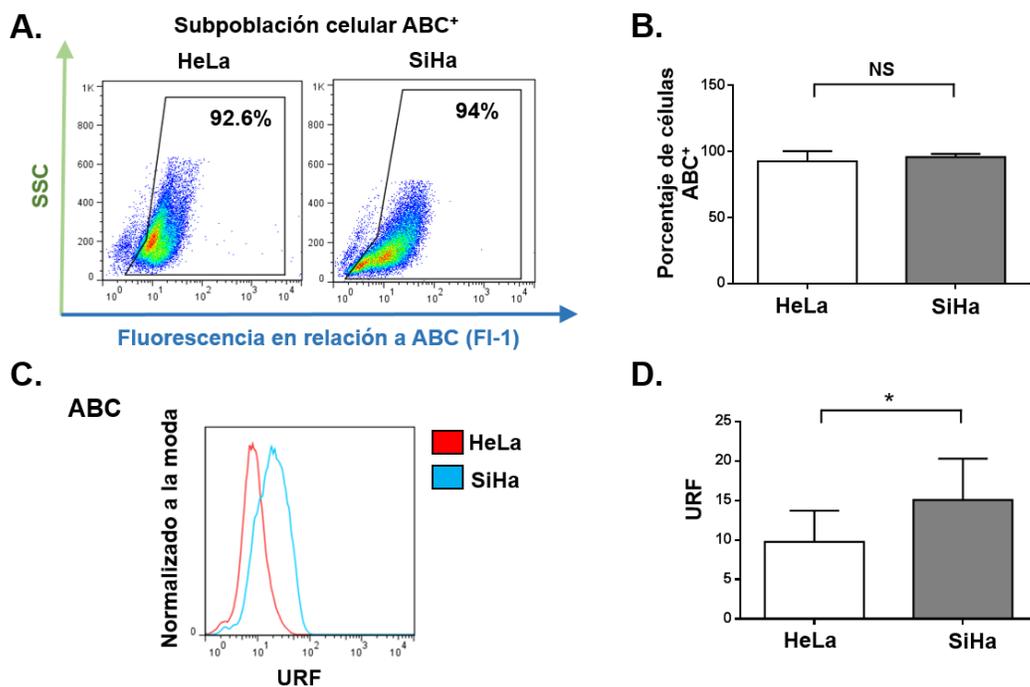


Figura 8. Las células HeLa y SiHa son ABC⁺ en cultivos en monocapa. **A.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra ABC. Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. **B.** Cuantificación de los porcentajes de las células ABC⁺ de HeLa y SiHa ($n=9$). **C.** Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo en células HeLa (rojo) y SiHa (azul) teñidas contra ABC. **D.** Cuantificación de las URF en relación a ABC en HeLa y SiHa ($n=18$). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los niveles de ABC entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$. NS representa diferencia no significativa.

Siendo que las células SiHa tuvieron mayores niveles de ABC total en comparación a las células HeLa, sugería una diferencia en la activación de la vía WNT/ β -catenina, por lo que se analizaron los niveles proteínicos de C-MYC, cuyo gen es blanco de la transcripción mediada por β -catenina. El análisis por citometría de flujo mostró que las células SiHa tuvieron un porcentaje mayor de células C-MYC⁺ respecto a las células HeLa (Fig. 9A), siendo significativa esta diferencia ($18.57\% \pm 3.39\%$ para HeLa y $62.97\% \pm 11.53\%$ para SiHa; $n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 9B). Sin embargo, la cantidad de C-MYC en las células positivas, evaluada por la fluorescencia, no tuvo cambio estadísticamente significativo entre ambas líneas celulares, aunque pareció tender a la misma diferencia (7.77 ± 0.94 URF para HeLa y 16.22 ± 5.15 URF para SiHa; $n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 9C, D). Finalmente se analizaron los niveles totales de C-MYC por Western Blot y al normalizar la densitometría con GAPDH como control de carga, no hubo

diferencia significativa entre HeLa y SiHa (1.42 ± 0.13 URI para HeLa y 1.41 ± 0.06 URI para SiHa; $n=4$; $p \leq 0.05$) (Fig. 9E, F), lo que señala que a pesar de la diferencia en los niveles totales de ABC entre HeLa y SiHa, los niveles semejantes en el núcleo pudieran reflejarse en una activación basal de la vía WNT/ β -catenina similar en ambos tipos de células.

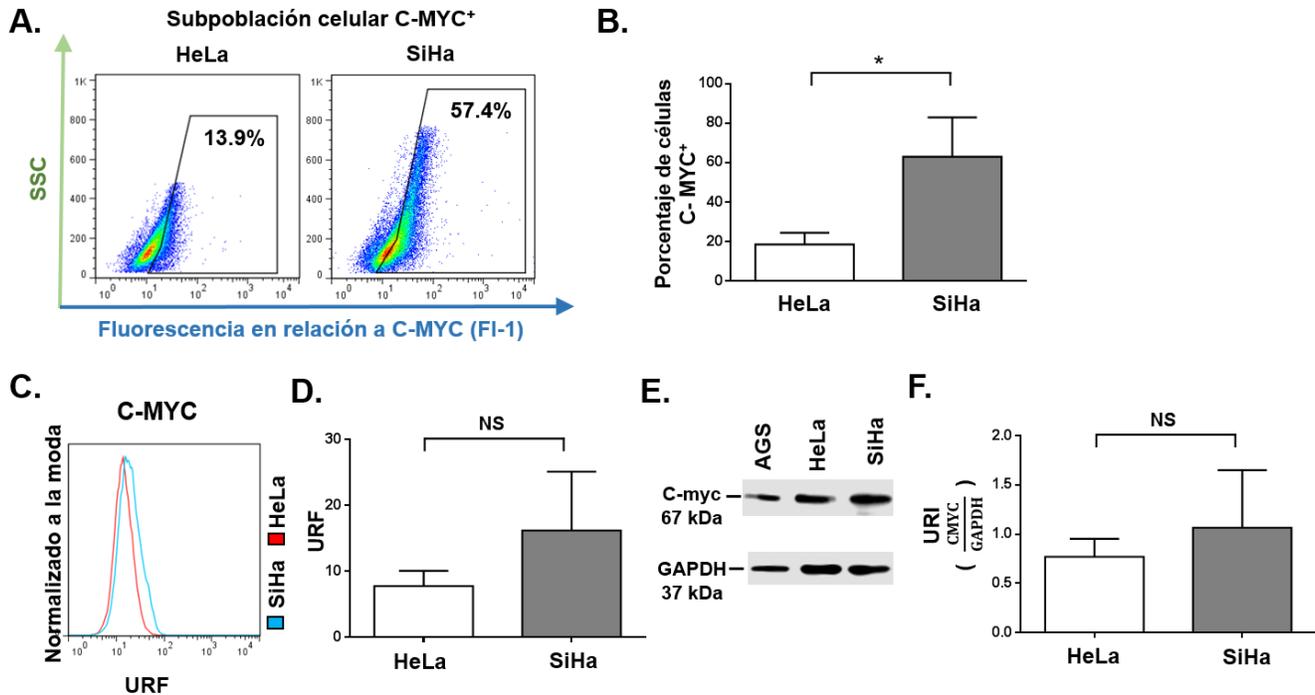


Figura 9. Las células HeLa y SiHa son C-MYC⁺ en cultivos en monocapa. **A.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra C-MYC. Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. **B.** Cuantificación de los porcentaje de las células C-MYC⁺ en HeLa y SiHa ($n=3$). **C.** Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo en células HeLa (rojo) y SiHa (azul) teñidas contra C-MYC. **D.** Cuantificación de las URF en relación a C-MYC en HeLa y SiHa ($n=3$). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia. **E.** Western Blot representativo de C-MYC en extractos totales de AGS (control positivo), HeLa y SiHa. GAPDH: control de carga. **F.** Cuantificación de la densitometría de C-MYC por análisis de Western Blot normalizado con GAPDH ($n=4$). URI: Unidades Relativas de Intensidad. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los niveles de C-MYC entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student. * representa significancia estadística con $p < 0.05$. NS representa diferencia no significativa.

7.2 Las células HeLa y SiHa expresan proteínas transmembranales relacionadas a la vía WNT/ β -catenina

Los niveles proteicos de β -catenina dentro de las células, en condiciones normales, son regulados principalmente por la unión de los ligandos WNT con el receptor Frizzled (FZD). Dado que la mayoría de las células HeLa y SiHa fueron β -catenina⁺, se analizó el porcentaje de células con FZD por citometría de flujo. El análisis demostró que el $1.83\% \pm 0.2\%$ de las células HeLa y el $2.36\% \pm 0.5\%$ de las células SiHa fueron FZD⁺ (Fig. 10A), sin diferencia significativa entre ambos tipos de células ($n=6$; $p \leq 0.05$) (Fig. 10B). Estos porcentajes fueron interesantes porque, a pesar de que la mayoría de las células fueron β -catenina⁺ y ABC⁺ en HeLa y SiHa, solo un bajo porcentaje de células en un cultivo en monocapa tiene el receptor FZD capaz de reconocer a los ligandos WNT.

Esto nos llevó a pensar que, las células FZD⁺ podrían relacionarse con las CTC en el Cacú, dado que las CTC, son un bajo porcentaje en un cultivo en monocapa de HeLa o SiHa.

Para determinar si FZD se relaciona con las CTC, se evaluó LGR5, el cual es un receptor que activa a la vía WNT/ β -catenina en células HeLa y SiHa (Chen Q 2014) y que se asocia tanto a células troncales normales como a CTC en otros tejidos (Kemper K 2012; Carmon KS 2011). Es por esto que se analizó el porcentaje de células LGR5⁺ en los cultivos en monocapa, mediante citometría de flujo. El análisis mostró que, similar a lo visto para el receptor FZD, las células LGR5⁺ fueron un bajo porcentaje, sin diferencia significativa entre ambas líneas celulares ($0.76\% \pm 0.14\%$ para HeLa y $1.31\% \pm 0.55\%$ para SiHa, $n=6$; $p \leq 0.05$) (Fig. 10C, D).

Una vez que se identificaron células FZD⁺ y células LGR5⁺ en HeLa y SiHa, fue de importancia conocer si las mismas células FZD⁺ también eran LGR5⁺, y así poder sugerir una posible relación entre FZD y las CTC. El análisis por citometría de flujo, mediante el doble marcaje demostró que, existe una subpoblación celular FZD⁺/LGR5⁺, siendo de $0.74\% \pm 0.12\%$ en las células HeLa y $0.96\% \pm 0.1\%$ en las células SiHa, sin diferencia estadística entre ambas células ($n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 10E, F). Estos resultados demostraron que, existe una subpoblación celular que posee ambos tipos de receptores, capaces de activar la vía WNT/ β -catenina, y particularmente sugiere que FZD pudiera asociarse con las CTC en este modelo celular, a pesar de que represente un porcentaje bajo en el cultivo en monocapa.

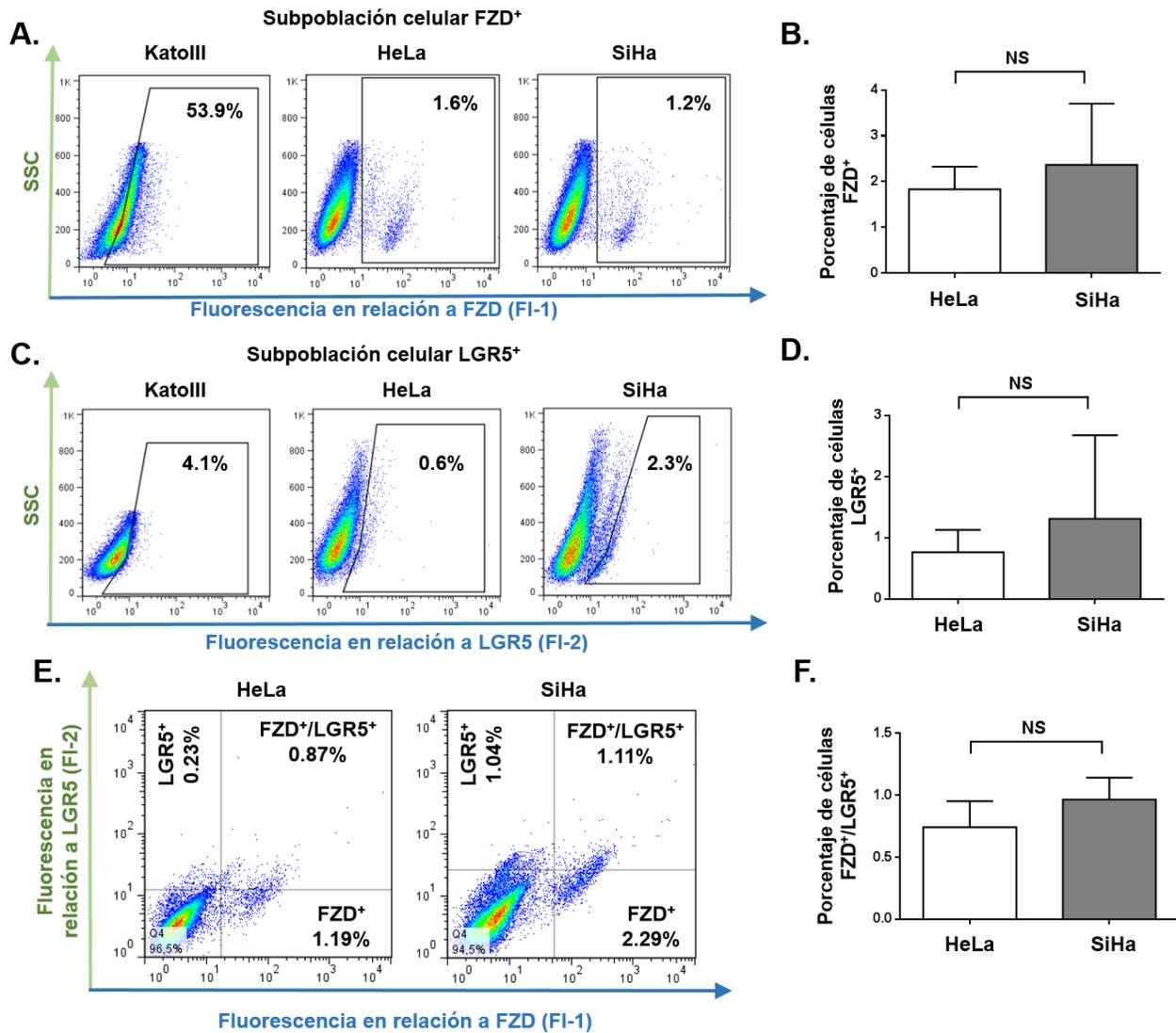


Figura 10. Subpoblación celular FZD⁺/LGR5⁺ en los cultivos en monocapa de HeLa y SiHa. Diagramas representativos de citometría de flujo de células Kat0III (control positivo), HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra FZD o LGR5 (A y C, respectivamente). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. B y D. Cuantificación de los porcentajes de las células FZD⁺ o LGR5⁺, respectivamente, en células HeLa y SiHa (n=6). E. Diagramas representativos de citometría de flujo de células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra LGR5 (eje x) y FZD (eje y). Se muestran los porcentajes de FZD⁺, LGR5⁺ y FZD⁺/LGR5⁺ dentro de los cuadrantes correspondientes. F. Cuantificación de los porcentajes de las células FZD⁺/LGR5⁺ en HeLa y SiHa (n=3). Todos los gráficos de columna muestran el promedio ± DE. La diferencia en los porcentajes entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

Dado que el porcentaje de las células FZD⁺/LGR5⁺ fue menor que las células FZD⁺ y que las células LGR5⁺, implicó que existen células FZD⁺ que no expresan LGR5, y viceversa. Para conocer la proporción de estas células, se analizó la subpoblación FZD⁺ que también expresó LGR5, revelando que el $60.93\% \pm 13.12\%$ de las células FZD⁺ en HeLa también fueron LGR5⁺, mientras que para SiHa fue del $66.95\% \pm 9.28\%$ (n=6), siendo similares los porcentajes entre ambas líneas celulares (Fig. 11A, B, C). De manera complementaria, el análisis demostró que el $41.62\% \pm 4.02\%$ de las células LGR5⁺ en HeLa también fueron FZD⁺, mientras que en las células SiHa fue el $77.76\% \pm 4.25\%$. En este caso,

si hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ambas líneas celulares ($n=9$; $p \leq 0.0001$), lo que significó que en SiHa la mayoría de las células LGR5⁺ expresaron también FZD, mientras que en HeLa fue la minoría (Fig. 11D, E, F), sugiriendo que la co-expresión de FZD y LGR5 es diferente entre las líneas celulares.

Es importante mencionar que el receptor FZD representa una familia compuesta de 10 miembros (en el caso del ser humano) y dado que los análisis anteriores fueron con base al reconocimiento de una secuencia común para todos los miembros, se procedió a analizar específicamente la presencia de FZD7, el cual se ha descrito en las células HeLa y SiHa, además que participa en funciones celulares propias de las CTC en otros tipos de cáncer. El análisis por citometría de flujo mostró que el $1.22\% \pm 0.61\%$ de las células HeLa y el $6.39\% \pm 3.22\%$ de las células SiHa fueron FZD7⁺, y aunque no fue estadísticamente diferente entre HeLa y SiHa, se requerirían de más réplicas biológicas para corroborar esto, pues pareciera ser mayor en SiHa ($n=7$; $p \leq 0.05$) (Fig. 12A, B).

La señalización en respuesta a un ligando WNT no solo es mediada por el receptor FZD, sino que actúa junto con el correceptor LRP, que en el caso del ser humano puede ser LRP5 o LRP6. Es por esto que, se analizó por citometría de flujo la presencia de células LRP⁺, en particular con LRP6, dada su relación con la activación de la vía WNT/ β -catenina. El análisis mostró que el $14.79\% \pm 2.23\%$ de las células HeLa y el $27.4\% \pm 5.81\%$ de las células SiHa fueron LRP6⁺, sin diferencia significativa entre HeLa y SiHa ($n=7$; $p \leq 0.05$) pero similar a lo observado con FZD7⁺, se requerirían de un mayor número de réplicas biológicas para corroborar esto, pues de igual manera pareciera ser mayor el porcentaje en SiHa (Fig. 12C, D). Con estos resultados, surgió el interés de evaluar la presencia de una subpoblación celular FZD7⁺/LRP6⁺ en los cultivos de monocapa de HeLa y SiHa. El análisis por doble marcaje demostró que el $1.33\% \pm 0.32\%$ de las células HeLa fue FZD7⁺/LRP6⁺, mientras que para las células SiHa fue de $3.01\% \pm 1.26\%$, sin ser diferente entre ambas células ($n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 12E, F). Estos resultados corroboraron que, existe un porcentaje bajo de las células HeLa y SiHa capaz de reconocer un ligando WNT a través de FZD7 y LRP6.

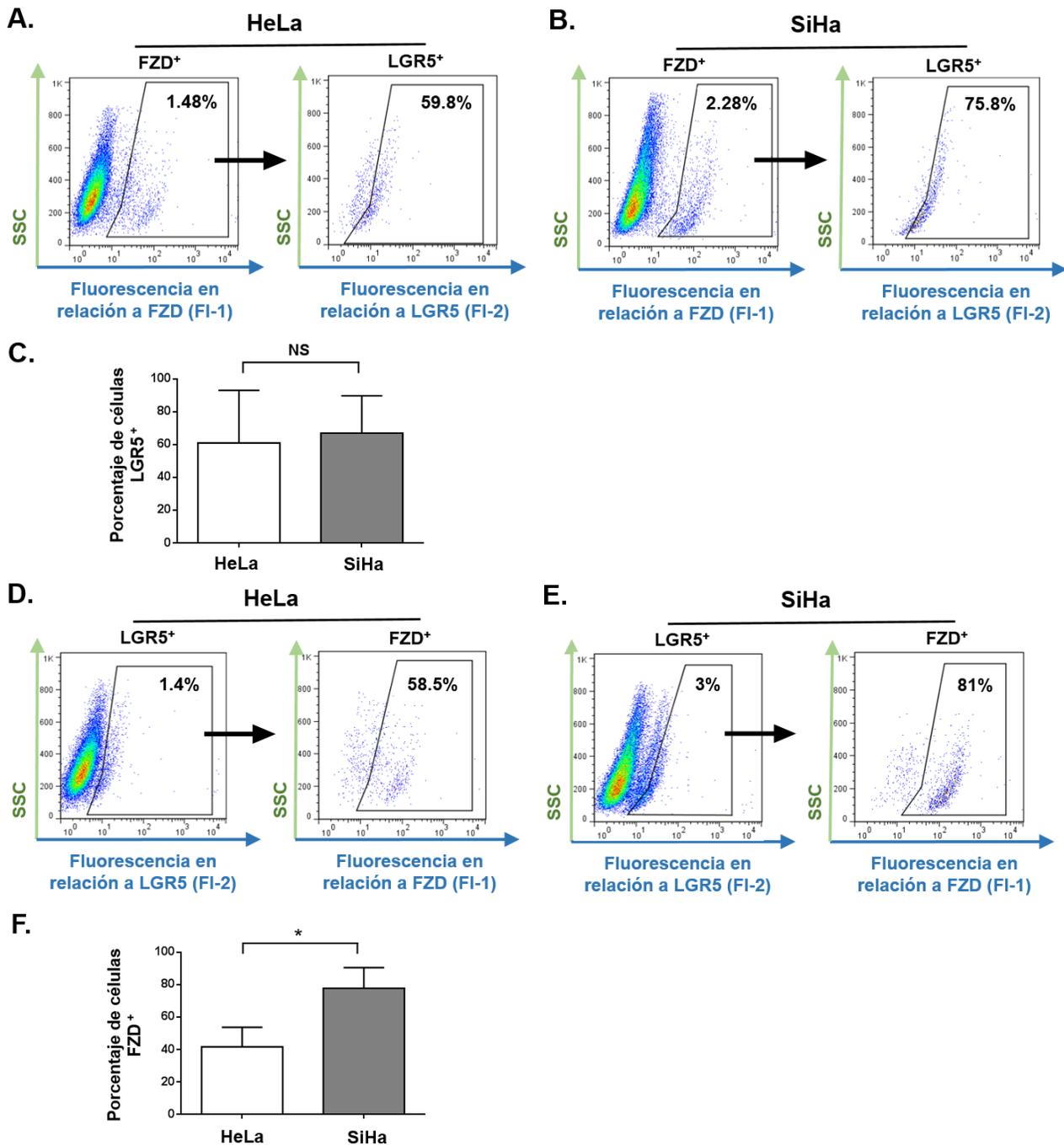


Figura 11. Una subpoblación celular FZD⁺ es LGR5⁺ y una subpoblación celular LGR5⁺ es FZD⁺ en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa. A, B. Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; donde se muestra la estrategia para cuantificar las células LGR5⁺ en la subpoblación FZD⁺. Las células FZD⁺ (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para evaluar el porcentaje de células LGR5⁺ (panel derecho). **C.** Cuantificación de los porcentajes de las células LGR5⁺ en la subpoblación celular FZD⁺ en HeLa y SiHa (n=6). **D, E.** Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; que muestran la estrategia para cuantificar las células FZD⁺ en la subpoblación LGR5⁺. Las células LGR5⁺ (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para evaluar el porcentaje de células FZD⁺ (panel derecho). **F.** Cuantificación de los porcentajes de las células FZD⁺ en la subpoblación LGR5⁺ en células HeLa y SiHa (n=9). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. Todos los

gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los porcentajes entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$. NS representa diferencia no significativa.

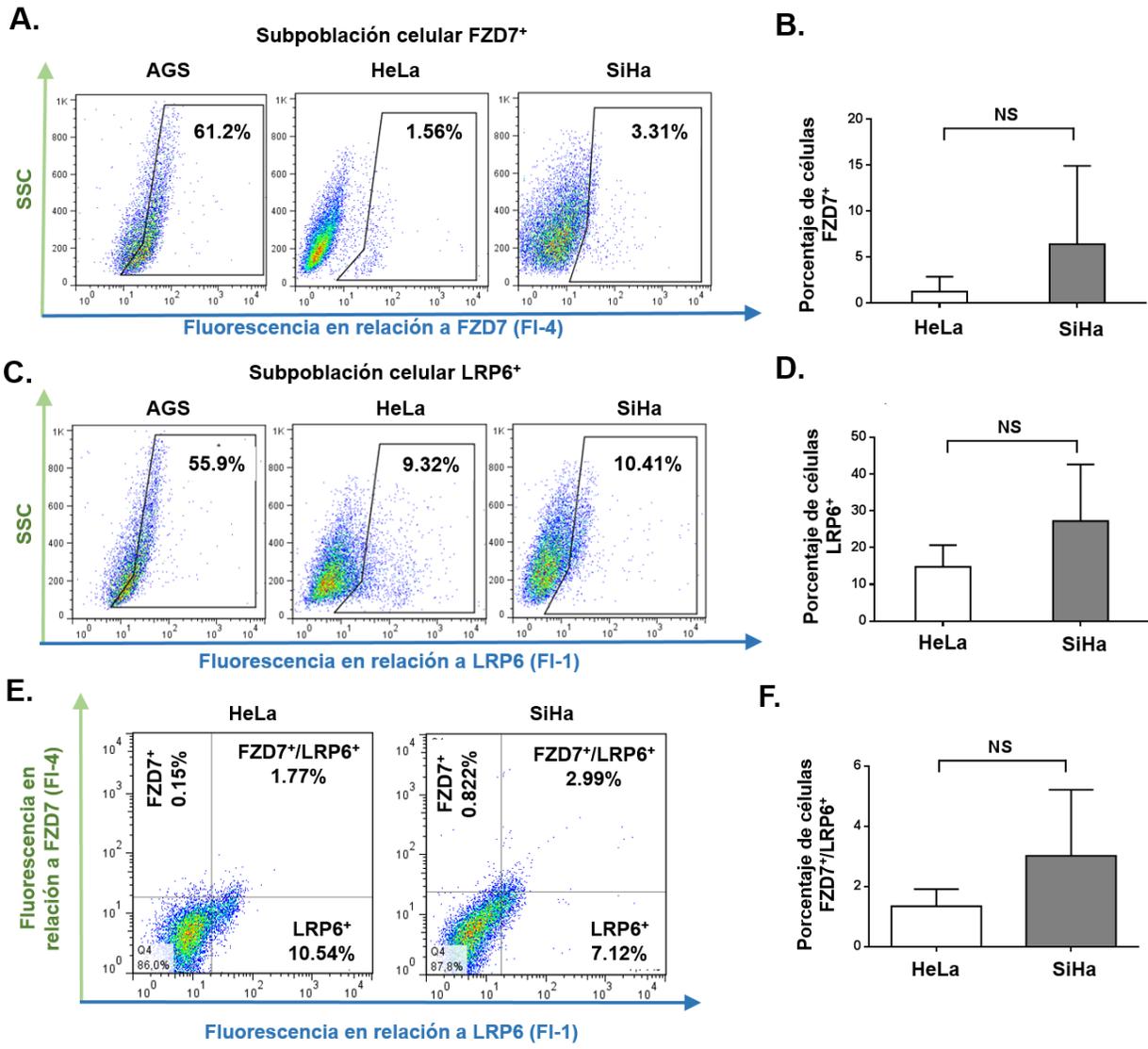


Figura 12. Subpoblación celular FZD7⁺/LRP6⁺ en los cultivos en monocapa de HeLa y SiHa es. Diagramas representativos de citometría de flujo de células AGS (control positivo), HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra FZD7 o LRP6 (A y C, respectivamente). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. B y D. Cuantificación de los porcentajes de las células FZD7⁺ o LRP6⁺, respectivamente, en células HeLa y SiHa (n=7). E. Diagramas representativos de citometría de flujo de células HeLa y SiHa cultivadas en monocapa y teñidas contra LRP6 (eje x) y FZD7 (eje y). Se muestran los porcentajes de FZD7⁺, LRP6⁺ y FZD7⁺/LRP6⁺ dentro de los cuadrantes correspondientes. F. Cuantificación de los porcentajes de las células FZD7⁺/LRP6⁺ en HeLa y SiHa (n=3). Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los porcentajes entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

De manera notable, fue evidente que las células LRP6⁺ representaron un mayor porcentaje que las células FZD7⁺ en HeLa y SiHa, lo que llevó a investigar el porcentaje dentro de las células LRP6⁺ que también fueran FZD7⁺ y viceversa. Los resultados mostraron que el 88.33% \pm 7.62% de las células

HeLa FZD7⁺ también fueron LRP6⁺, mientras que en las células SiHa fue de 58.33% ± 14.52 (n=6; $p \leq 0.05$) (Fig. 13A, B, C). Estos resultados señalaron que la mayoría de las células FZD7⁺ fueron LRP6⁺ para ambas líneas celulares, sin diferencia significativa entre éstas.

Por otra parte, el análisis para conocer el porcentaje dentro de las células LRP6⁺ que también fuera FZD7⁺ mostró ser de 14.6% ± 3.23% para las células HeLa y de 24.13% ± 2.78% para las células SiHa, sin diferencia significativa entre ambas (n=6; $p \leq 0.05$) (Fig. 13D, E, F). Estos resultados sugieren que las células LRP6⁺ pudieran expresar otros miembros de la familia FZD o que LRP6 pudiera tener funciones independientes del receptor FZD.

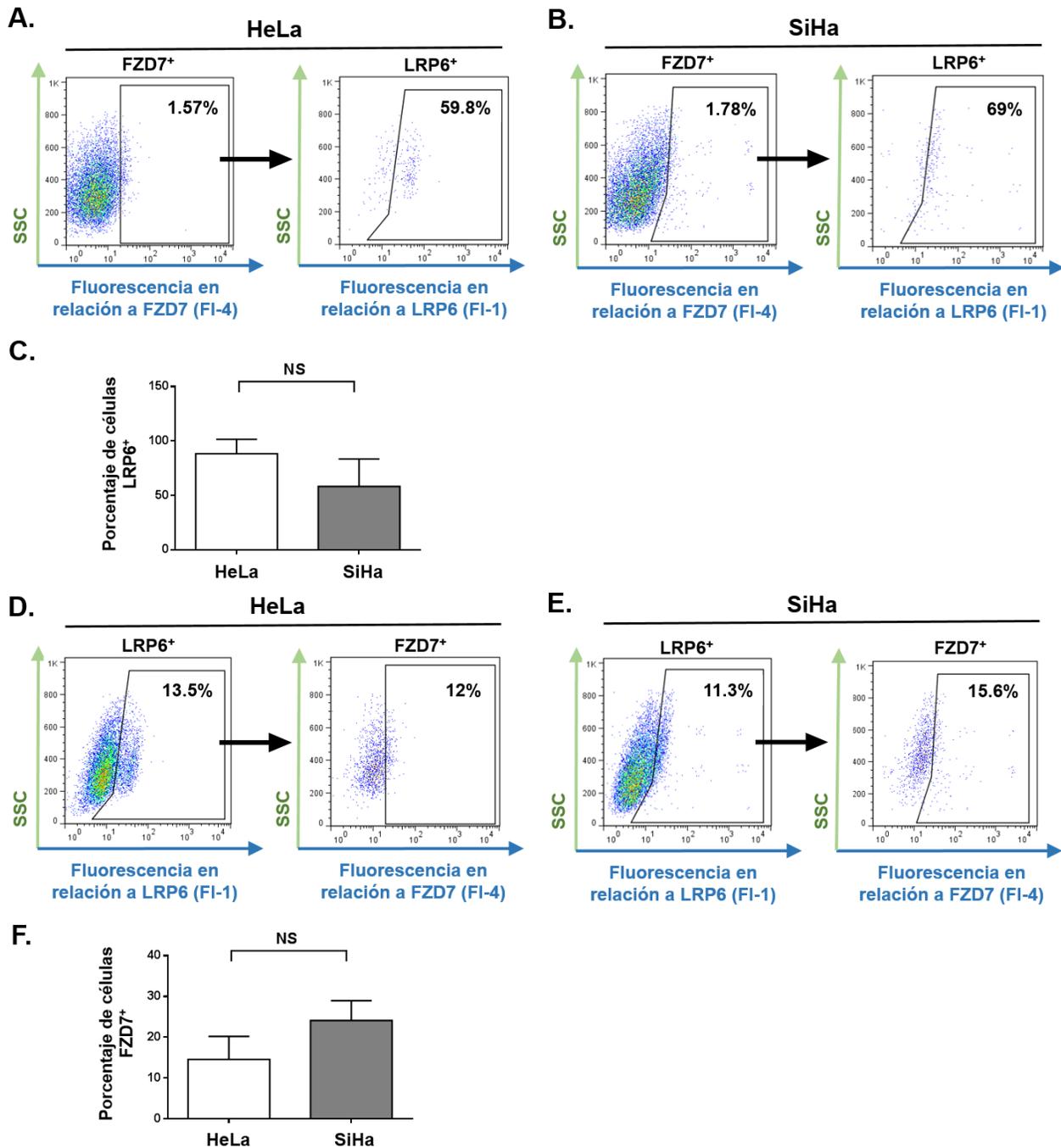


Figura 13. Una subpoblación celular FZD7⁺ es LRP6⁺ y una subpoblación celular LRP6⁺ es FZD7⁺ en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa. A, B. Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; que muestran la estrategia para evaluar las células LRP6⁺ en la subpoblación FZD7⁺. Las células FZD7⁺ (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para evaluar el porcentaje de células LRP6⁺ (panel derecho). **C.** Cuantificación de los porcentajes de las células LRP6⁺ en la subpoblación FZD7⁺ en HeLa y SiHa (n=6). **D, E.** Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; que muestran la estrategia para evaluar las células FZD7⁺ en la subpoblación LRP6⁺. Las células LRP6⁺ (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para evaluar el porcentaje de células FZD7⁺ (panel derecho). **F.** Cuantificación de los porcentajes de las células FZD7⁺ en la subpoblación LRP6⁺ en células HeLa y SiHa (n=6). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los porcentajes entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

7.3 Comparación en la Vía WNT/ β -catenina de cultivos en monocapa con cultivos de esferas de células HeLa y SiHa.

Una vez que se caracterizó parte de los componentes de la vía WNT/ β -catenina en los cultivos de monocapa de las células HeLa y SiHa, condición donde hay un bajo porcentaje de CTC, se establecieron cultivos de esferas, donde se incrementan los porcentajes de CTC, y se compararon los cambios en los componentes de esta vía.

Datos preliminares de nuestro laboratorio mostraron que en el día 3 de formación de esferas es el mayor incremento en el porcentaje de CTC, referidas como ALDH^{ALTO}, al usar el sistema ALDEFLUORTM que identifica la alta actividad de ALDH en células individuales. Para corroborar estos resultados, se midió el porcentaje de células ALDH^{ALTO} tanto en monocapa como en las esferas al día 3 en HeLa y SiHa y se compararon.

Los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de las células ALDH^{ALTO} en los cultivos de esferas, con HeLa cambiando de 2.24% \pm 0.36% a 10.38% \pm 3.05% y SiHa de 4.1% \pm 0.75% a 12.38% \pm 2.58%, siendo estadísticamente significativo para ambas líneas celulares (n=10, $p \leq 0.05$) (Fig. 14A, B). Estos resultados permitieron establecer el día 3 de formación de esferas como lapso de tiempo para analizar la vía WNT/ β -catenina en los siguientes estudios.

En primer lugar, fue de interés conocer si el porcentaje de las células FZD⁺ aumentaba en las esferas, dada su posible relación con las CTC. El análisis por citometría de flujo mostró mayores porcentajes de las células FZD⁺ en las esferas, alcanzando porcentajes de 9.82 % \pm 1.11% en las células HeLa y 5.99% \pm 1.46% en las células SiHa, con diferencia estadísticamente significativa respecto al cultivo en monocapa (n=8; $p \leq 0.05$). Esto sugería que si el porcentaje de las células FZD⁺ se enriqueció de manera similar que el porcentaje de las células ALDH^{ALTO}, era posible que ambos marcadores celulares podrían identificar a la misma subpoblación celular. No obstante, los resultados mostraron que menos del 1% de un cultivo en monocapa fue ALDH^{ALTO}/FZD⁺, específicamente 0.11% \pm 0.05% en HeLa y 0.09% \pm 0.03% en SiHa (n=3) (Fig. 14E, F).

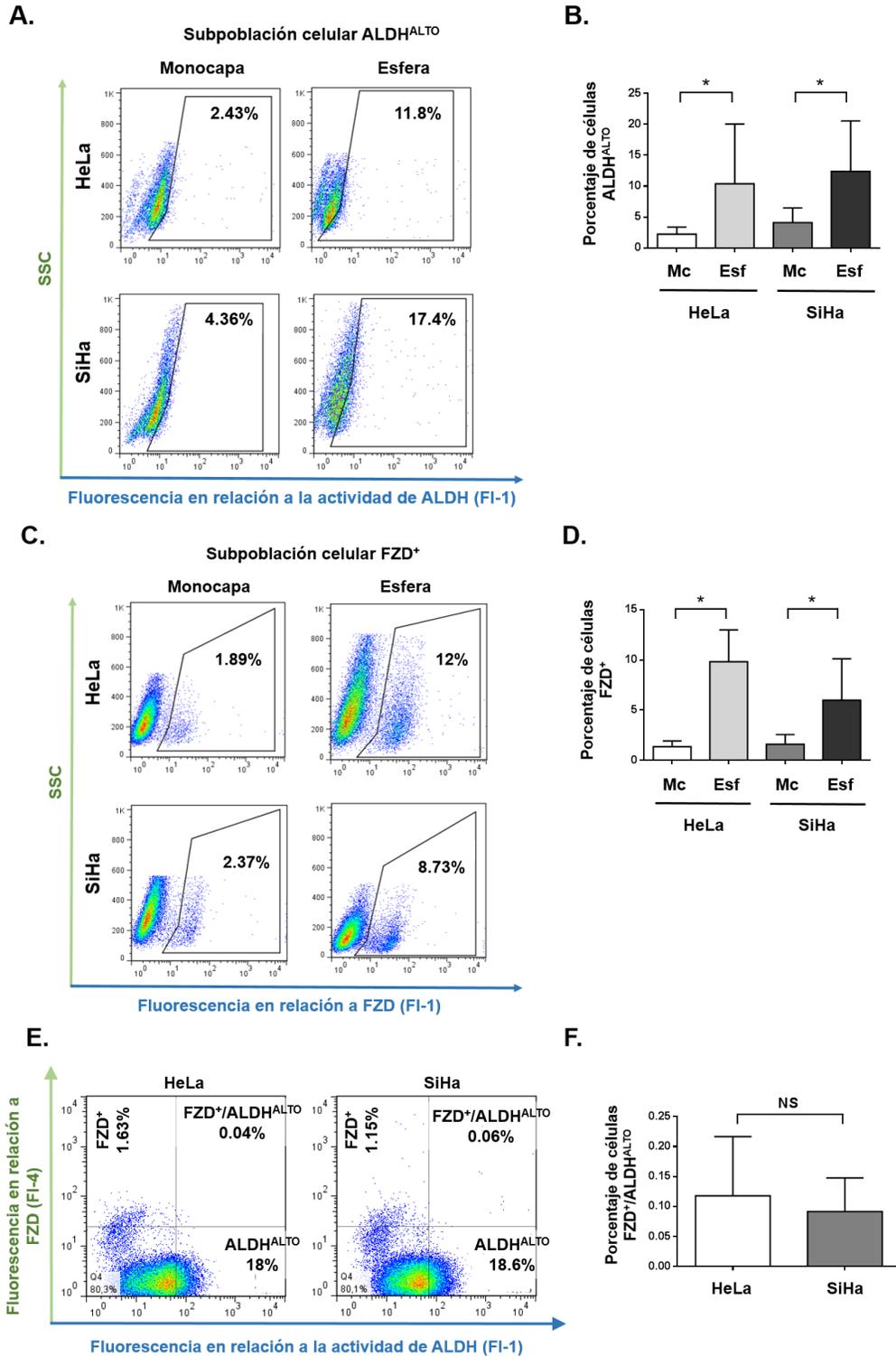


Figura 14. Las células ALDH^{ALTO} y FZD⁺ incrementan su porcentaje en cultivos de esferas de HeLa y SiHa. **A.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFLUORTM de cultivos en monocapa o esfera de HeLa o SiHa. **B.** Cuantificación de los porcentajes de las células ALDH^{ALTO} en células HeLa y SiHa en cultivos de monocapa (Mc) y esferas (Esf) (n=10). **C.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células teñidas contra FZD de cultivos de monocapa o esfera de HeLa o SiHa. **D.**

Cuantificación de los porcentajes de las células FZD⁺ en células HeLa y SiHa en cultivos de monocapa (Mc) y esferas (Esf) (n=8). **E.** Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFLUOR™ (eje x) y FZD (eje y) de células HeLa y SiHa en cultivos de monocapa. Se muestran los porcentajes de ALDH^{ALTO}, FZD⁺ y ALDH^{ALTO}/FZD⁺ dentro de los cuadrantes correspondientes. **F.** Cuantificación de los porcentajes de las células ALDH^{ALTO}/FZD⁺ en HeLa y SiHa en cultivos en monocapa (n=3). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. Todos los gráficos de columna muestran el promedio ± DE. La diferencia en los porcentajes entre Monocapa (Mc) y Esferas (Esf) o entre HeLa y SiHa se determinaron por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$. NS representa diferencia no significativa.

El bajo porcentaje de las células con el doble marcaje ALDH^{ALTO}/FZD⁺ puede explicarse principalmente por dos razones: el primero es que ambos marcadores celulares no identifican a las mismas células en un cultivo de monocapa de HeLa o SiHa, o que en efecto la subpoblación celular está en una proporción muy baja. Como complemento a este análisis, se cuantificó el porcentaje dentro de las células ALDH^{ALTO} que también fueran FZD⁺. Este análisis mostró que 0.19% ± 0.05% de las células HeLa y 0.19% ± 0.02% de las células SiHa con el marcaje de ALDH^{ALTO} también fueron FZD⁺ (n=3), lo que apoya la idea de que son marcajes independientes, al menos en las condiciones experimentales del presente trabajo (Fig. 15A, B, C). En adición, también se analizó el porcentaje dentro de las células FZD⁺ que fuera ALDH^{ALTO} y se observó el 7.41% ± 3.63% en las células HeLa y el 4.27% ± 0.9% en las células SiHa (n=3) (Fig. 15D, E, F). A pesar de que estos porcentajes fueron mayores, es difícil concluir que en efecto existe o no una subpoblación celular con ambos marcadores celulares, en parte por el bajo número de repeticiones biológicas realizadas y porque no se corroboró mediante otra técnica.

El siguiente paso fue conocer si la vía WNT/ β -catenina se activa o inactiva en las esferas, lo cual se traduce en cambios en los niveles proteicos de β -catenina, por lo que se realizó un análisis de β -catenina por citometría de flujo y se compararon los niveles de las células de las esferas con las células crecidas en monocapa. Se observó una disminución de la fluorescencia en relación a β -catenina en las esferas, tanto para HeLa como SiHa, cambiando de 20.20 ± 3 URF a 11.21 ± 2 URF en HeLa y de 14.44 ± 2.13 URF a 8.44 ± 1.43 URF en SiHa, y aunque la desviación estándar no permite hacerlo evidente, esta diferencia fue estadísticamente significativa respecto al cultivo en monocapa, (n=11 para HeLa y n=9 para SiHa; $p \leq 0.05$) (Fig. 16A, B). Para conocer si ABC se comportaba en una manera similar, se realizó el mismo tipo de análisis y se compararon ambos tipos de cultivo. Los resultados mostraron que de manera similar a β -catenina, ABC disminuyó en las esferas (9.14 ± 0.72 URF en monocapa y 5.19 ± 0.43 URF en esfera de HeLa, 11.19 ± 1.02 URF en monocapa y 3.98 ± 0.84 URF en esfera de SiHa) lo que resultó de igual manera estadísticamente significativo (n=15 para HeLa y n=11 para SiHa; $p \leq 0.05$) (Fig. 16C, D). Estos resultados señalaron que tanto β -catenina como ABC, disminuyeron en las células que formaron las esferas de HeLa o de SiHa en comparación a los cultivos de monocapa, a pesar de un enriquecimiento de las células FZD⁺ o de ALDH^{ALTO} en el mismo contexto celular.

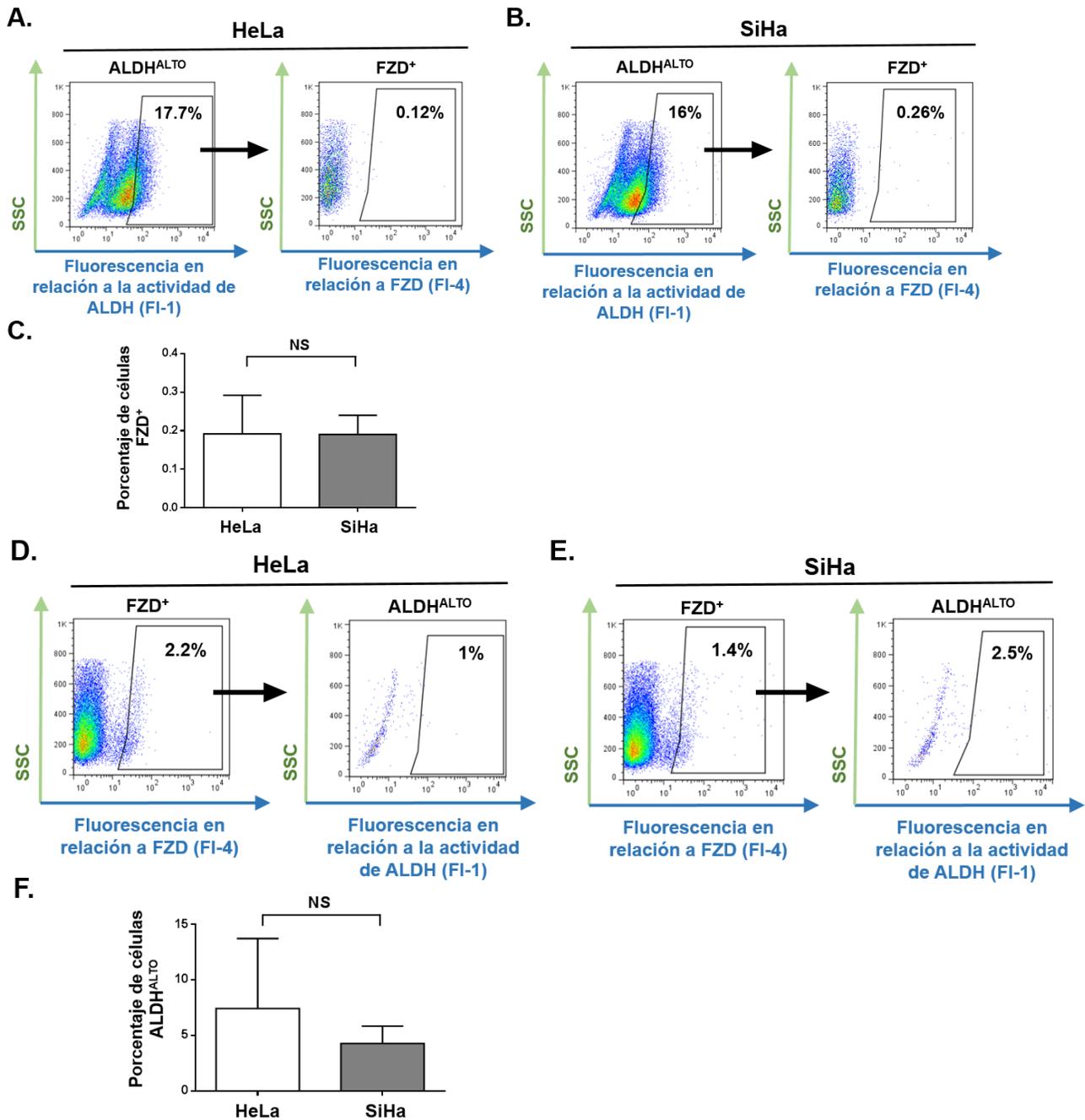


Figura 15. Las células ALDH^{ALTO} y las células FZD⁺ son subpoblaciones independientes en HeLa y SiHa.

A, B. Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; donde se muestra la estrategia para cuantificar las células FZD⁺ en la subpoblación ALDH^{ALTO}. Las células ALDH^{ALTO} (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para evaluar el porcentaje de células FZD⁺ (panel derecho). **C.** Cuantificación de los porcentajes de las células FZD⁺ en la subpoblación ALDH^{ALTO} en HeLa y SiHa (n=3). **D, E.** Diagramas representativos de citometría de flujo en HeLa y SiHa, respectivamente; donde se muestra la estrategia para evaluar las células ALDH^{ALTO} en la subpoblación FZD⁺. Las células FZD⁺ (panel izquierdo) fueron subseleccionadas para cuantificar el porcentaje de células ALDH^{ALTO} (panel derecho). **F.** Cuantificación de los porcentajes de las células ALDH^{ALTO} en la subpoblación FZD⁺ en HeLa y SiHa (n=3). Los valores dentro de los diagramas representan los porcentajes de las células positivas. SSC: Dispersión lateral. Todos los gráficos de

columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los porcentajes entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

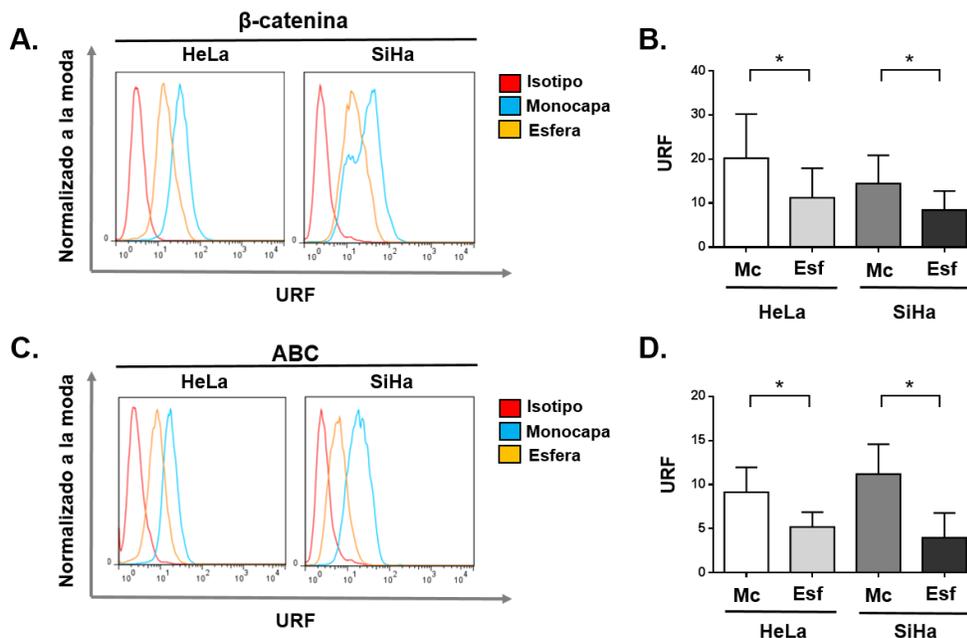


Figura 16. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) disminuyen en cultivos de esferas de HeLa y SiHa.

A. Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo de Isotipo (rojo) y células teñidas contra β -catenina en cultivo de monocapa (azul) y esfera (amarillo) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **B.** Cuantificación de las URF en relación a β -catenina en HeLa y SiHa en cultivos en monocapa (Mc) y esfera (Esf) ($n=11$ para HeLa y $n=9$ para SiHa). **C.** Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo de Isotipo (rojo) y células teñidas contra ABC en cultivo de monocapa (azul) y esfera (amarillo) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **D.** Cuantificación de las URF en relación a ABC en HeLa y SiHa en cultivos en monocapa (Mc) y esfera (Esf) ($n=15$ para HeLa y $n=11$ para SiHa). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en las URF entre monocapa (Mc) y esferas (Esf) se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

No solo cambios en los niveles proteicos de β -catenina se regulan por la vía WNT/ β -catenina, sino también la relocalización intracelular de β -catenina debido a su papel en la actividad transcripcional, es por esto que se evaluaron mediante Western Blot, los niveles de β -catenina en las fracciones subcelulares. Los resultados mostraron que β -catenina disminuyó en la fracción citoplasmática/membranal de las esferas respecto al cultivo en monocapa, aunque solo fue estadísticamente significativo para SiHa, ya que la desviación estándar en HeLa fue mayor, lo que implica hacer más réplicas biológicas para corroborar esta diferencia en esta última línea celular (1.62 ± 0.33 URI en monocapa y 1.31 ± 0.54 URI en esfera de HeLa, 1.22 ± 0.08 URI en monocapa y 0.32 ± 0.08 URI en esfera de SiHa; $n=4$; $p \leq 0.05$) (Fig. 17A, B). Posteriormente, al evaluar a ABC mediante Western Blot, fue similar a lo visto con β -catenina, con una disminución en la fracción citoplasmática/membranal de esferas en comparación a las células en cultivo de monocapa tanto en HeLa como en SiHa (1.26 ± 0.1 URI en monocapa y 0.59 ± 0.05 URI en esfera de HeLa, 0.28 ± 0.13 URI en monocapa y 0.07 ± 0.02 URI en esfera de SiHa), aunque en este caso fue estadísticamente significativo solo para HeLa ($n=4$ para HeLa y $n=7$ para SiHa; $p \leq 0.05$) (Fig. 17D, E).

Para conocer si β -catenina y ABC disminuyen en la fracción citoplasmática/membranal de las esferas de HeLa y SiHa respecto a los cultivos en monocapa, se determinaron las veces de cambio. Las veces de cambio se calcularon al dividir la densitometría normalizada de β -catenina de las células en monocapa entre la densitometría normalizada de β -catenina de sus respectivas esferas. Esto dio como resultado una razón de 1.72 ± 0.47 para HeLa y 4.61 ± 1.22 para SiHa ($n=4$), que siendo mayores a 1 en ambos casos, demostró que β -catenina disminuyó en la fracción citoplasmática/membranal de las esferas en ambas líneas celulares, con mayor cambio en SiHa (Fig. 17C). El mismo cálculo de veces de cambio se realizó para ABC, resultando en 2.21 ± 0.31 para HeLa y 1.65 ± 0.24 para SiHa ($n=3$), que también siendo mayores a 1, evidenció una disminución de ABC en el citoplasma/membrana de las esferas respecto a las células de monocapa de HeLa y SiHa, solo que en este caso con mayor cambio en HeLa (Fig. 17F).

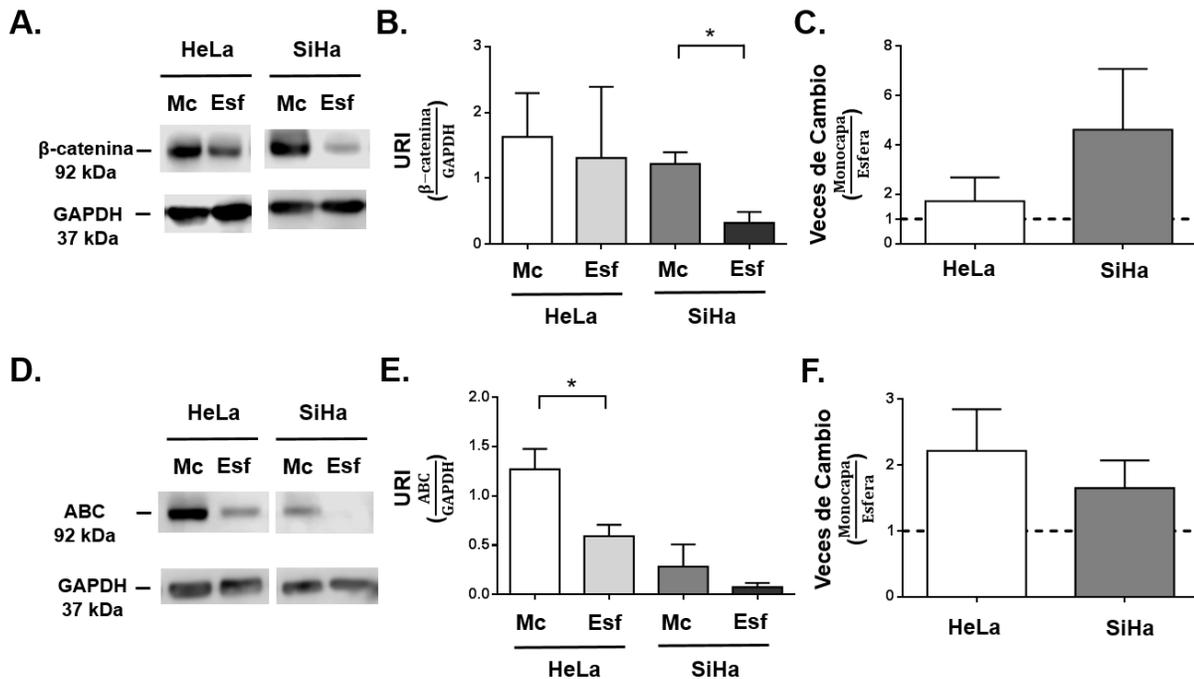


Figura 17. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) disminuyen en la fracción citoplasmática/membranal en cultivos de esferas de HeLa y SiHa. **A.** Western Blot representativo de β -catenina en la fracción citoplasmática/membranal de cultivo en monocapa (Mc) y esfera (Esf) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **B.** Cuantificación de las URI en relación a β -catenina en la fracción citoplasmática/membranal. Normalizado con GAPDH como control de carga ($n=4$). **C.** Comparación en las veces de cambio de β -catenina de Monocapa vs Esfera en células HeLa y SiHa para la fracción citoplasmática/membranal ($n=4$). **D.** Western Blot representativo de ABC en la fracción citoplasmática/membranal de cultivo en monocapa (Mc) y esfera (Esf) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **E.** Cuantificación de la URI en relación a ABC en la fracción nuclear. Normalizado con GAPDH como control de carga ($n=3$). **F.** Comparación en las veces de cambio de ABC de Monocapa vs Esfera en células HeLa y SiHa para la fracción citoplasmática/membranal ($n=3$). URI: Unidades Relativas de Intensidad. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en las URI entre monocapa (Mc) y esferas (Esf) o entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

La disminución de β -catenina y ABC en la fracción citoplasmática/membranal de las esferas sugirió que la degradación de β -catenina se había favorecido, es decir la inactivación de la vía WNT/ β -catenina, sin embargo resultó crucial evaluar si bajo esta idea β -catenina también ya no se traslocaba

al núcleo. Para ello, se midieron por Western Blot, los niveles de β -catenina y ABC en las fracciones nucleares de esferas y de células en monocapa. Los resultados mostraron que β -catenina incrementó en las células HeLa (1.47 ± 0.43 URI en monocapa y 2.078 ± 0.58 URI en esfera; $n=3$) pero disminuyó en las células SiHa (0.88 ± 0.27 URI en monocapa y 0.6 ± 0.18 URI en esfera; $n=7$) (Fig. 18A, B). Del mismo modo se evaluó ABC, que similar a β -catenina, incrementó en núcleos de esferas de HeLa y disminuyó en núcleos de esferas de SiHa, aunque sin diferencia estadísticamente significativa debido a la desviación estándar y al bajo número de réplicas biológicas (0.84 ± 0.21 URI en monocapa y 1.46 ± 0.32 URI en esfera de HeLa, 0.44 ± 0.12 URI en monocapa y 0.26 ± 0.09 URI en esfera de SiHa; $n=3$ para HeLa y $n=7$ para SiHa; $p \leq 0.05$) (Fig. 18 D, E). Sin embargo, similar a la fracción citoplasmática/membranal, se determinaron las veces de cambio, dividiendo la densitometría normalizada de β -catenina de las células en monocapa entre la densitometría normalizada de β -catenina de su correspondiente cultivo de esferas, permitiendo conocer cambios en cultivos individuales. Los resultados mostraron que en las células HeLa la razón fue de 0.74 ± 0.22 en HeLa ($n=3$), indicando que β -catenina aumentó en el núcleo de las células de las esferas. Por el contrario, las células SiHa tuvieron una razón de 2.56 ± 1 ($n=7$) lo que señaló una disminución de β -catenina en el núcleo de las células de esferas (Fig. 18C).

Para ABC, se calcularon de igual modo las veces de cambios, dando como resultado una razón de 0.58 ± 0.11 en HeLa ($n=3$) y 2.3 ± 0.77 en SiHa ($n=7$), que de manera similar a β -catenina, ABC nuclear aumentó y disminuyó en células de esferas de HeLa y SiHa, respectivamente (Fig. 18F). Por lo tanto, estos resultados mostraron que una disminución en los niveles de β -catenina o ABC no necesariamente se relaciona con una disminución en los niveles de β -catenina y ABC en el núcleo de las células. Además que, de manera interesante, mientras que la formación de esferas llevó a un aumento de β -catenina y ABC en el núcleo de las células HeLa, el mismo tipo de cultivo llevó a una disminución de β -catenina y ABC en el núcleo de las células SiHa.

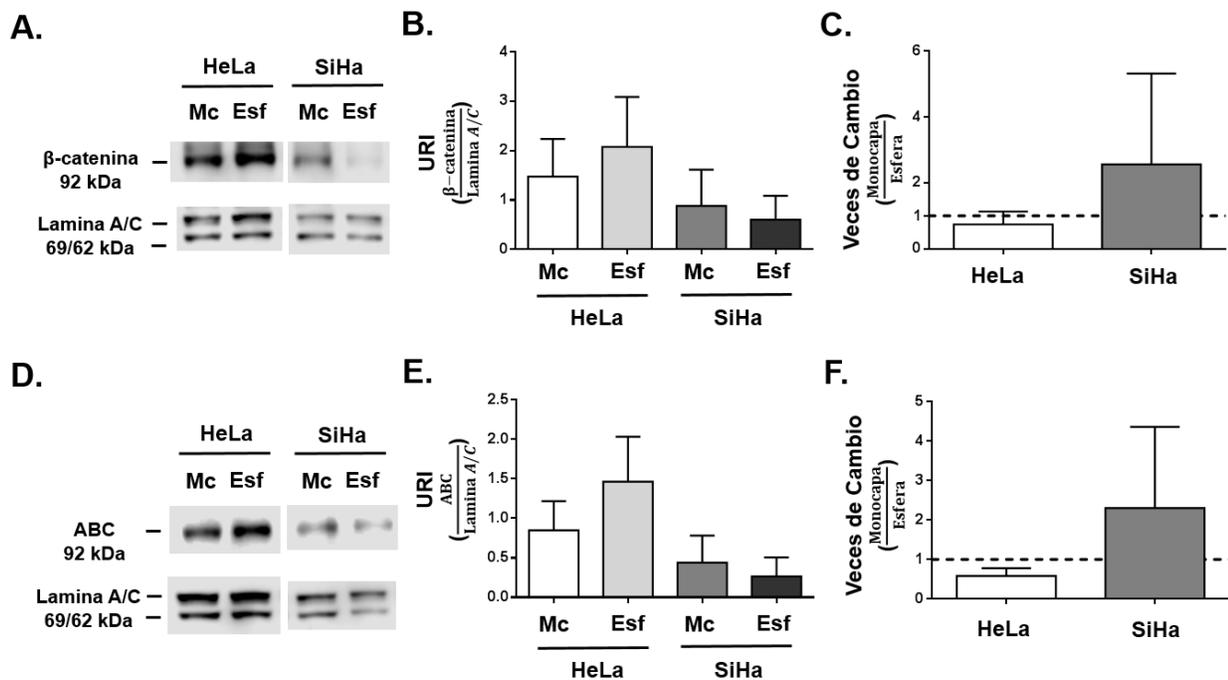


Figura 18. β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en la fracción nuclear en esferas incrementan en HeLa y disminuyen en SiHa. A. Western Blot representativo de β -catenina en la fracción nuclear de cultivo en monocapa (Mc) y esfera (Esf) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **B.** Cuantificación de las URI en

relación a β -catenina en la fracción nuclear. Normalizado con Lamina A/C como control de carga (n=3 para HeLa y n=7 para SiHa). **C.** Comparación en las veces de cambio de β -catenina de Monocapa vs Esfera en células HeLa y SiHa para la fracción nuclear (n=3 para HeLa y n=7 para SiHa). **D.** Western Blot representativo de ABC en la fracción nuclear de cultivo en monocapa (Mc) y esfera (Esf) de HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **E.** Cuantificación de las URI en relación a ABC en la fracción nuclear. Normalizado con Lamina A/C como control de carga (n=3 para HeLa y n=7 para SiHa). **F.** Comparación en las veces de cambio de ABC de Monocapa vs Esfera en células HeLa y SiHa para la fracción nuclear (n=3 para HeLa y n=7 para SiHa). URI: Unidades Relativas de Intensidad. Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en las URI entre monocapa (Mc) y esferas (Esf) o entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch.

7.4 Efecto de la activación o inhibición de la vía WNT/ β -catenina en el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en cultivos de monocapa y esferas de HeLa y SiHa.

La formación de esferas en HeLa y SiHa resultó en un incremento en la subpoblación celular ALDH^{ALTO}, marcador asociado a las CTC. Las CTC, en otros tipos de cáncer, se regulan por diferentes mecanismos moleculares como la activación de la vía WNT/ β -catenina, lo que pudiera sugerir que detrás del enriquecimiento de las células ALDH^{ALTO}, podría estar la activación de la vía WNT/ β -catenina. Sin embargo, a partir de nuestros resultados, parece que esta vía se activa en las células HeLa, pero no así en las células SiHa, durante la formación de esferas. Es por esto que fue de importancia evaluar los efectos de activar o inhibir la vía WNT/ β -catenina para establecer si esta vía se relaciona con las CTC, particularmente con las identificadas como ALDH^{ALTO}.

Para la activación o inhibición de la vía WNT/ β -catenina, las células fueron expuestas a moléculas exógenas durante los cultivos en monocapa durante 48 h y se determinó el porcentaje de células ALDH^{ALTO}. En el caso de la activación, se empleó la molécula GSK3-IX que inhibe la actividad de la cinasa GSK3 β , la cual fosforila a β -catenina para su posterior degradación. Con este mecanismo de acción, se favorece la estabilización de β -catenina y su translocación al núcleo para la activación transcripcional de los genes blancos (Fig. 19A). En el caso de la inhibición de la vía WNT/ β -catenina, se utilizó la molécula ENDO-IWR, que mediante una interacción directa con AXINA favorece su estabilización, incrementando sus niveles de proteína. Este incremento de AXINA promueve la formación del complejo para la degradación de β -catenina en el citoplasma, por tanto disminuyendo los niveles de β -catenina en el citoplasma, e indirectamente también los niveles de β -catenina en el núcleo (Fig. 19B).

Para demostrar que, las dosis empleadas en los estudios posteriores no resultaran tóxicas para las células, se evaluó la viabilidad a diferentes concentraciones de GSK3-IX o ENDO-IWR en las células HeLa y SiHa en cultivos de monocapa. Para esto, se realizaron dos tipos de métodos: el primero fue por el ensayo de exclusión de tinción, utilizando al azul de tripano como marcador, el cual se basa en la exclusión de la tinción en células vivas con la membrana íntegra, pero tinción de las células muertas por la desintegración de la membrana. Dados los primeros ensayos que evaluaron la acción de las moléculas en la vía WNT/ β -catenina, se escogió una exposición de 48 h a las diferentes concentraciones de cada molécula en cultivos de monocapa. Al término de las 48 h, se realizó la tinción y tras el conteo celular, se calculó el porcentaje de células muertas. La Figura 20, incisos A y C, muestran la cuantificación del porcentaje de las células muertas para cada concentración de GSK3-IX y ENDO-IWR, respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre las células sin tratar (control) y las células tratadas con cada una de las concentraciones indicadas,

demonstrando así que los rangos de dosis utilizados de GSK3-IX y ENDO-IWR no fueron tóxicos para HeLa o SiHa ($n=4$; $p \leq 0.05$) (Fig. 20A, C).

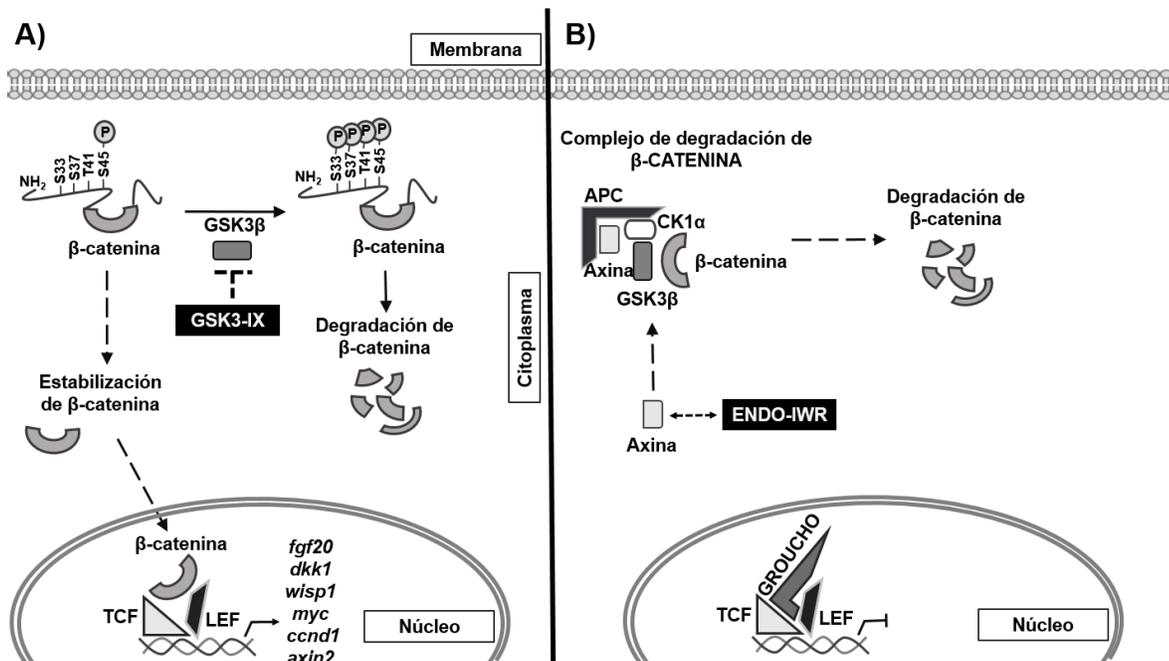


Figura 19. Mecanismos de acción de las moléculas GSK3-IX y ENDO-IWR en la vía WNT/β-catenina. **A.** La inhibición directa de GSK3β por GSK3-IX impide que β-catenina se fosforile en el Amino terminal, por lo que ya no se reconoce por el proteosoma. Esto estabiliza los niveles de proteína de β-catenina en el citoplasma, lo que lleva a su translocación nuclear y la activación transcripcional de los genes blancos. **B.** La interacción de ENDO-IWR con AXINA lleva a un incremento en los niveles de la proteína de Axina. Este incremento favorece la formación del complejo de degradación de β-catenina, desencadenando en un decremento en los niveles de β-catenina en el citoplasma.

Sin embargo, para confirmar que las dosis empleadas de GSK3-IX o ENDO-IWR no fueran tóxicas, se midió también la viabilidad de las células mediante el ensayo de MTT, método que permitió reconocer que las células, no solo mantuvieron la integridad de su membrana analizada por el ensayo de exclusión de tinción, sino que también se mantuvieron metabólicamente activas, por lo que se midió la reducción del MTT intracelular, a través de espectrofotometría. Los resultados muestran las absorbancias correspondientes, sin una diferencia significativa para cada concentración de GSK3-IX o ENDO-IWR, respecto a las células sin tratamiento ($n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 20B, D). Esto corroboró lo observado con el ensayo de exclusión de tinción, donde las dosis de las moléculas GSK3-IX o ENDO-IWR utilizadas no fueron tóxicas para las células HeLa o SiHa.

Una vez que, se determinó que los rangos de dosis de GSK3-IX o ENDO-IWR no fueron tóxicos, se analizó el efecto de cada molécula en β-catenina y ABC. Para esto, se midieron los niveles de proteína por citometría de flujo, tras el tratamiento de 48 h en cultivos en monocapa.

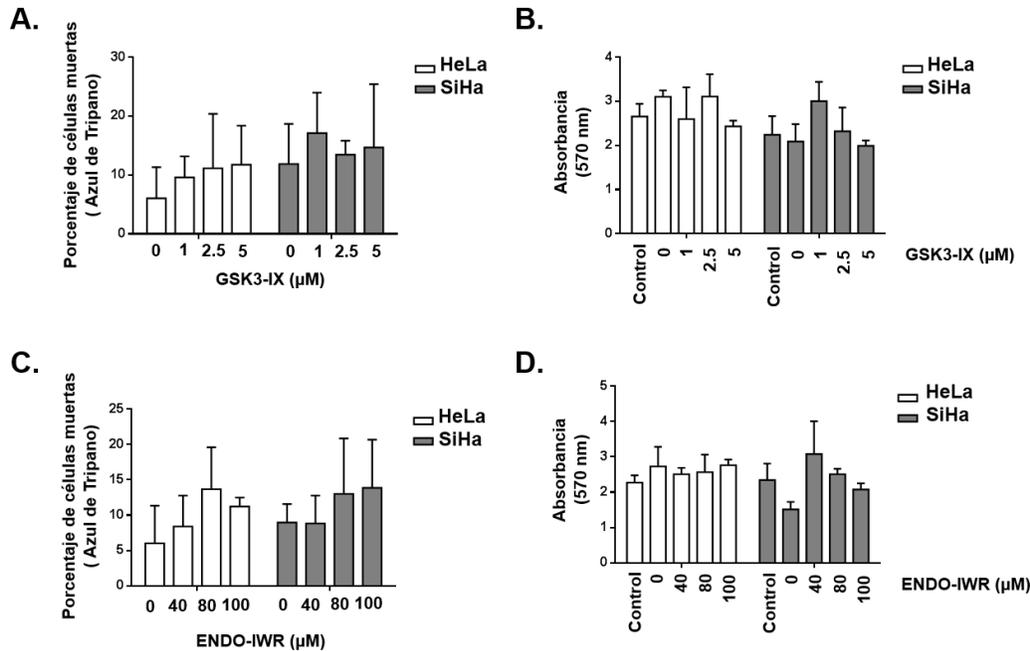


Figura 20. GSK3-IX o ENDO-IWR no afectan la viabilidad de las células HeLa y SiHa a las 48 h en cultivos en monocapa. A y C. Cuantificación del porcentaje de número de células muertas evaluado mediante la tinción de Azul de Tripiano con el tratamiento de GSK3-IX (A) o ENDO-IWR (C) a las concentraciones indicadas en HeLa (blanco) y SiHa (gris) (n=4). **B y D.** Medición de la absorbancia para medir la viabilidad por el ensayo de MTT bajo el tratamiento de GSK3-IX (B) o ENDO-IWR (D) a las concentraciones indicadas en HeLa (blanco) y SiHa (gris) (n=3). Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los porcentajes o en la absorbancia entre las células tratadas y las células control se determinó por un Análisis de Varianza (ANOVA).

Primero, se muestran los resultados por el tratamiento con GSK3-IX, activador de la vía WNT/ β -catenina. El análisis demostró un incremento de la fluorescencia en relación a β -catenina con 5 μ M de GSK3-IX para HeLa y SiHa cuyas veces de cambio, calculados al dividir las URF de las células tratadas (tratamiento) entre las URF de las respectivas células sin tratar (control), resultaron ser de 1.89 ± 0.63 en HeLa y de 2.38 ± 0.78 en SiHa, sin embargo no fue significativamente estadístico, posiblemente por el bajo número de réplicas biológicas (n=3; $p \leq 0.05$) (Fig. 21A, B). Además, se evaluó ABC del mismo modo y, similar a lo observado para β -catenina, la fluorescencia en relación a ABC incrementó a la concentración de 5 μ M de GSK3-IX en HeLa y SiHa, Al calcular las veces de cambio, de igual modo que con β -catenina resultaron ser mayor a 1, con 1.76 ± 0.24 en HeLa y 2.67 ± 0.57 en SiHa, es decir ABC también aumentó con 5 μ M de GSK3-IX, aunque fue estadísticamente significativo solo para SiHa (n=3) (Fig. 21C, D). Este incremento de β -catenina por el tratamiento de GSK3-IX, es posible que se dé a nivel de estabilización, ya que aumentaron también los niveles de ABC, lo que significó que β -catenina aumentó en su forma no fosforilada, que iría acorde al modo de acción de GSK3-IX, el cual inhibe a GSK3 β . Dado que el efecto más evidente en el incremento de β -catenina y ABC fue con 5 μ M de GSK3-IX, se decidió escoger esta concentración para los estudios posteriores, aunque quedó la consideración de realizar más réplicas biológicas para corroborar dicho efecto, dadas las amplias desviaciones estándar.

Posteriormente, también se evaluaron los niveles de β -catenina y ABC, por citometría de flujo, tras un tratamiento de 48 h a diferentes dosis de ENDO-IWR, en cultivos de monocapa de HeLa y SiHa.

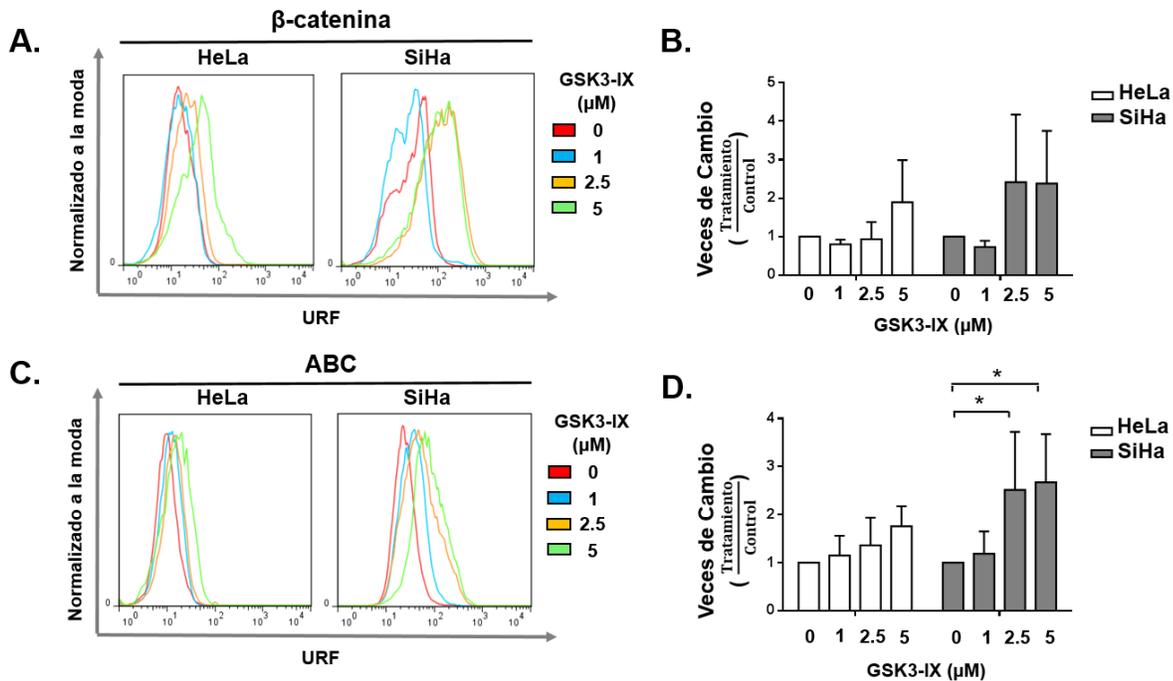


Figura 21. GSK3-IX incrementa los niveles de β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa. A y B. Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo de las URF en relación a β -catenina (A) o ABC (C) a las concentraciones indicadas para HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **C y D.** Comparación de las veces de cambio de β -catenina (B) o ABC (D) de las células en cada una de las concentraciones de GSK3-IX (Tratamiento) vs las células sin tratamiento (Control) (n=3). Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en las veces de cambio se determinó por un Análisis de Varianza (ANOVA). * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

Los resultados revelaron que la fluorescencia en relación a β -catenina, no mostró cambios evidentes a las diferentes concentraciones de ENDO-IWR. A la concentración más alta en nuestro estudio, es decir a 100 μ M, las veces de cambio calculadas al dividir las URF de las células tratadas (tratamiento) entre las URF de las células sin tratar (control), fueron de 0.97 ± 0.42 para HeLa y 0.59 ± 0.35 para SiHa, siendo en ambos casos menor a 1. Esto sugirió un decremento en los niveles de la proteína de β -catenina con ENDO-IWR, pero tras el análisis estadístico, no hubo una diferencia significativa en comparación al control, debido a la alta variabilidad y al bajo número de réplicas biológicas (n=3; $p \leq 0.05$) (Fig. 22A, B). Bajo la misma tendencia, los niveles de ABC no mostraron una disminución obvia entre las células tratadas con 100 μ M de ENDO-IWR en comparación a las células sin tratar, a pesar de que las veces de cambio, calculadas como en el caso de β -catenina, resultaran ser de 1.34 ± 0.35 en HeLa y 0.84 ± 0.05 en SiHa, sin diferencia estadísticamente significativa respecto al control (n=3; $p \leq 0.05$). Por tanto, estos resultados mostraron que a pesar de una tendencia de que los niveles de β -catenina y ABC disminuyeron en las células SiHa tras el tratamiento con ENDO-IWR, se requieren de más réplicas biológicas para establecer si existe una diferencia estadística que demuestre dicho efecto. Por su lado, en las células HeLa no se observó dicha tendencia, sin embargo también resulta importante más réplicas biológicas para determinar la ausencia de efecto de ENDO-IWR en estas células. A pesar de ello, dado que la mayor concentración de ENDO-IWR (100 μ M) mostró un mayor decremento en los niveles de β -catenina y ABC en SiHa, se escogió esta concentración para los estudios posteriores.

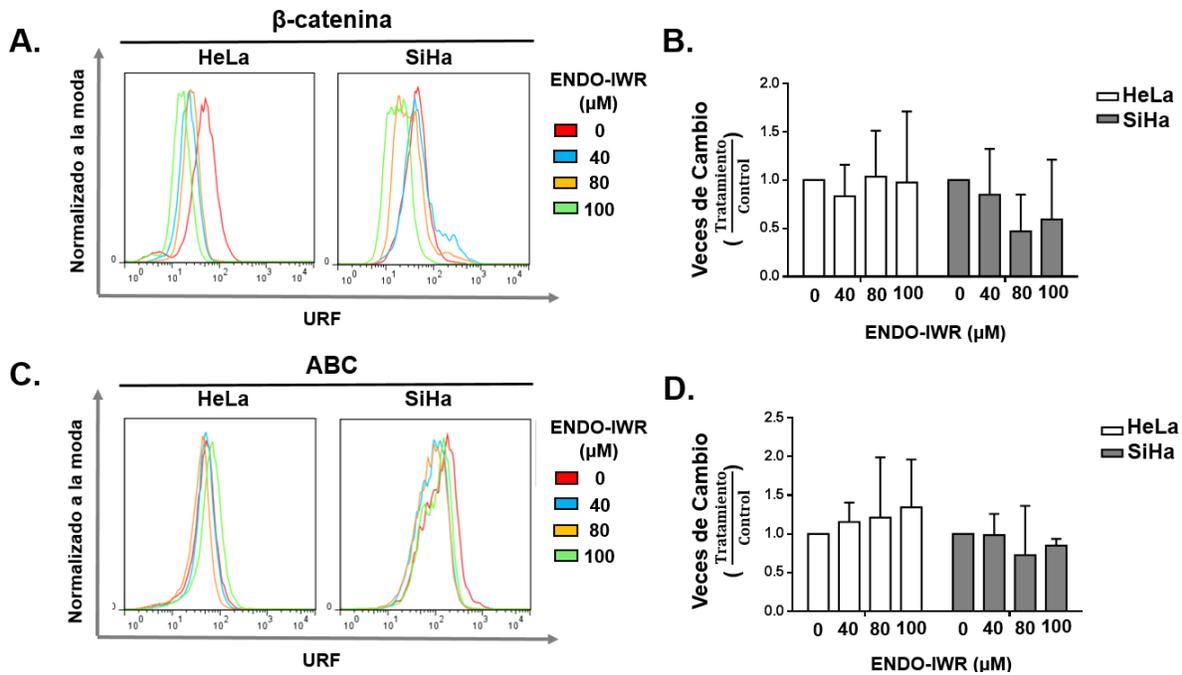


Figura 22. ENDO-IWR disminuye los niveles de β -catenina y β -catenina no fosforilada (ABC) en cultivos en monocapa de SiHa, pero no de HeLa. A y C. Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo de las URF en relación a β -catenina (A) o ABC (C) a las concentraciones indicadas para HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho). **B y D.** Comparación de las veces de cambio de β -catenina (B) o ABC (D) de las células en cada una de las concentraciones de ENDO-IWR (Tratamiento) vs las células sin tratamiento (Control) (n=3). Todos los gráficos de columna muestran el promedio \pm DE. La diferencia en los cambios de veces se determinó por un Análisis de Varianza (ANOVA).

El efecto de las moléculas GSK3-IX o ENDO-IWR sobre la activación o inhibición de la vía WNT/ β -catenina, no sólo se evaluó cuantificando la proteína de β -catenina y ABC, sino también fue crítico conocer si cada tratamiento desencadenaba una relocalización de β -catenina dentro de las células. Para esto, se analizó la localización subcelular de β -catenina por medio de microscopía de fluorescencia al término de las 48 h de tratamiento, ya sea con 5 μ M de GSK3-IX o con 100 μ M de ENDO-IWR, que fueron las concentraciones a las cuales se observó mayor efecto en los niveles de β -catenina y ABC, al menos para las células SiHa.

Para el tratamiento con 5 μ M de GSK3-IX, los resultados mostraron un incremento en la localización nuclear de β -catenina, tanto para HeLa como SiHa. Este patrón de localización nuclear fue similar al observado en las células AGS, en las cuales β -catenina se encuentra en el núcleo de manera constitutiva (Fig. 23A). Con estos resultados, se definió que tras el tratamiento con 5 μ M de GSK3-IX, se incrementa la localización nuclear de β -catenina a las 48 h en los cultivos de HeLa y SiHa.

Para el tratamiento con 100 μ M de ENDO-IWR, las células no mostraron una relocalización subcelular de β -catenina en los cultivos de monocapa de células HeLa o SiHa, lo que apuntó que, al menos en nuestras condiciones experimentales, ENDO-IWR no relocaliza a β -catenina dentro de las células tras las 48 h de tratamiento (Fig. 23A).

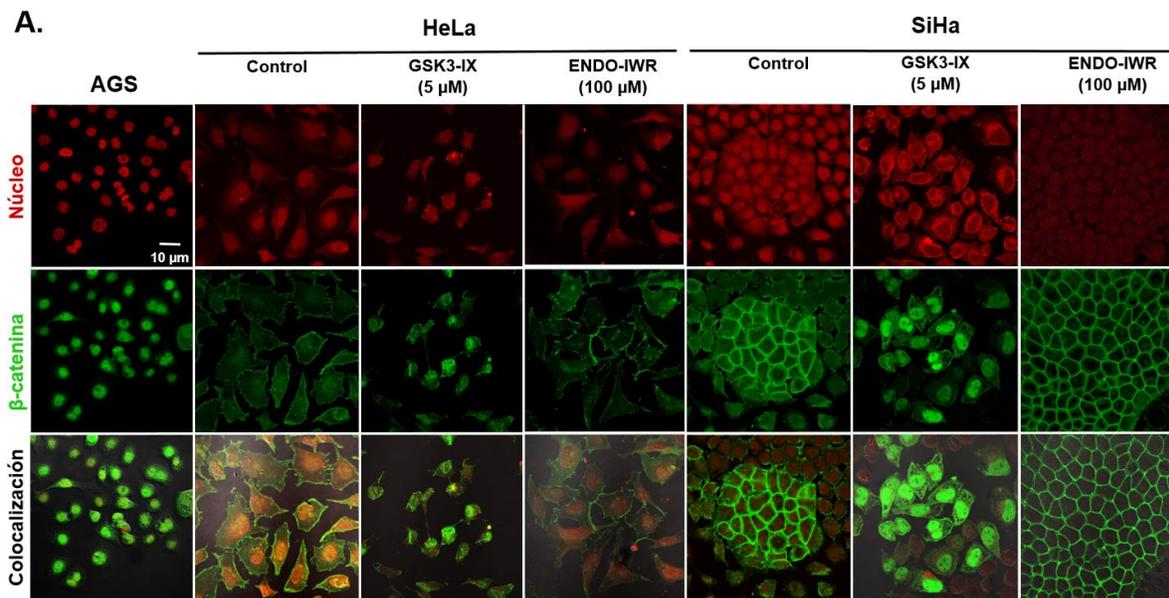


Figura 23. GSK3-IX o ENDO-IWR relocalizan intracelularmente a β -catenina en cultivos en monocapa de HeLa y SiHa. A Imágenes representativas por microscopía de fluorescencia de HeLa o SiHa con tinción para β -catenina (verde) y tinción nuclear con IP (rojo) en células sin tratamiento (Control) y con cada tratamiento indicado. Magnificación 40X. Escala de barra: 10 μ m.

Una vez que se evaluaron los efectos de GSK3-IX (activador) o ENDO-IWR (inhibidor) en β -catenina y ABC, nuestro objetivo fue establecer si estas moléculas influían de manera positiva y negativa, respectivamente, en el porcentaje de las CTC, referidas como la subpoblación celular ALDH^{ALTO}. Esto con el fin de conocer si las células ALDH^{ALTO} dependen de la vía WNT/ β -catenina para su mantenimiento o enriquecimiento en los cultivos de monocapa, sugerido por reportes donde por ejemplo, observan que el complejo β -catenina/TCF4 regula la expresión de ALDH1A1 (Coloc M 2015; Condello S 2015). Para esto, nuevamente se utilizó el sistema ALDEFLUORTM para cuantificar el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en los cultivos de monocapa, comparando los cultivos sin tratamiento con los cultivos tratados.

Como primer punto, se analizaron los cultivos tratados con 5 μ M de GSK3-IX durante 48 h, y tras dividir el porcentaje de ALDH^{ALTO} del cultivo tratado con su respectiva contraparte no tratada, se obtuvieron las veces de cambio de 0.53 ± 0.16 en HeLa y 4.89 ± 1.7 en SiHa (n=7). Estas veces de cambio indicaron que, la subpoblación ALDH^{ALTO} disminuyó en HeLa, pero aumentó en SiHa por el tratamiento con 5 μ M de GSK3-IX. Esto hizo evidente que GSK3-IX, en parte por la posible activación de la vía WNT/ β -catenina, tuvo un efecto diferente en los porcentajes de células ALDH^{ALTO} entre HeLa y SiHa, siendo esta diferencia entre ambas líneas celulares estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Fig. 24A, B).

El hecho de que GSK3-IX tuviera cambios en el porcentaje de células ALDH^{ALTO} de cultivos en monocapa de HeLa y SiHa, llevó a evaluar si la molécula ENDO-IWR pudiera llevar a un efecto contrario, dado que su mecanismo de acción sobre la vía WNT/ β -catenina es opuesto a GSK3-IX. Para esto se utilizó una estrategia experimental similar a la utilizada con la molécula GSK3-IX, pero tratando a los cultivos de monocapa con 100 μ M de ENDO-IWR durante 48 h y midiendo el porcentaje de células ALDH^{ALTO} al término del tratamiento. Los resultados revelaron que las células HeLa tuvieron 2.38 ± 1.01 veces de cambio, mientras que las células SiHa tuvieron 0.52 ± 0.13 veces de cambio. Esto

significó que, el tratamiento con ENDO-IWR llevó a un incremento en HeLa y un decremento en SiHa en el porcentaje de células ALDH^{ALTO}. Este efecto opuesto entre ambas líneas celulares no fue estadísticamente significativo a pesar de que la diferencia fue considerable, posiblemente por la alta variabilidad que presentó HeLa, lo que revela el requerimiento de un mayor número de réplicas biológicas para corroborar esta diferencia (n=7; $p \leq 0.05$) (Fig. 25A, B). A pesar de esto la tendencia fue que el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en las células HeLa disminuyó por GSK3-IX y aumentó por ENDO-IWR, mientras que en SiHa aumentó por GSK3-IX y disminuyó por ENDO-IWR.

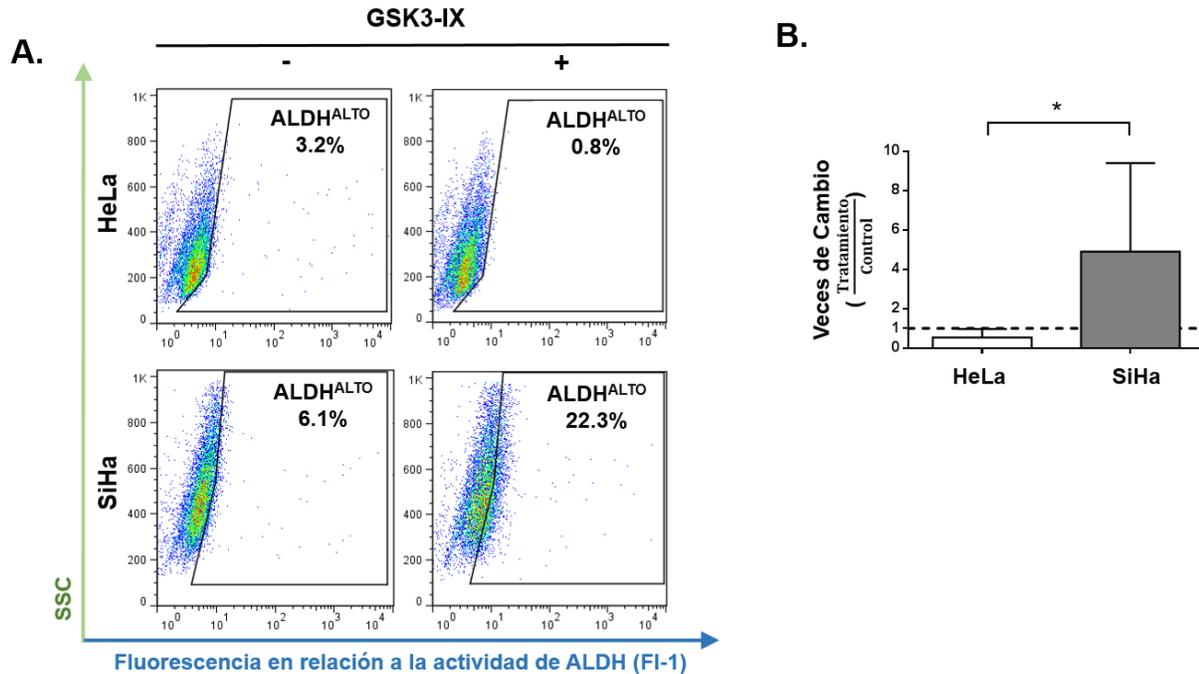


Figura 24. GSK3-IX disminuye el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en cultivos en monocapa de HeLa, mientras que lo incrementa en SiHa. A. Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFLUORTM de cultivos en monocapa sin tratamiento (-) y con 5 μ M de GSK3-IX (+) de HeLa (paneles superiores) y SiHa (paneles inferiores). **B.** Cuantificación de las veces de cambio de la subpoblación ALDH^{ALTO} de las células con tratamiento (tratamiento) vs las células sin tratamiento (control). El gráfico de columna muestra el promedio \pm DE (n=7). La diferencia en las veces de cambio entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

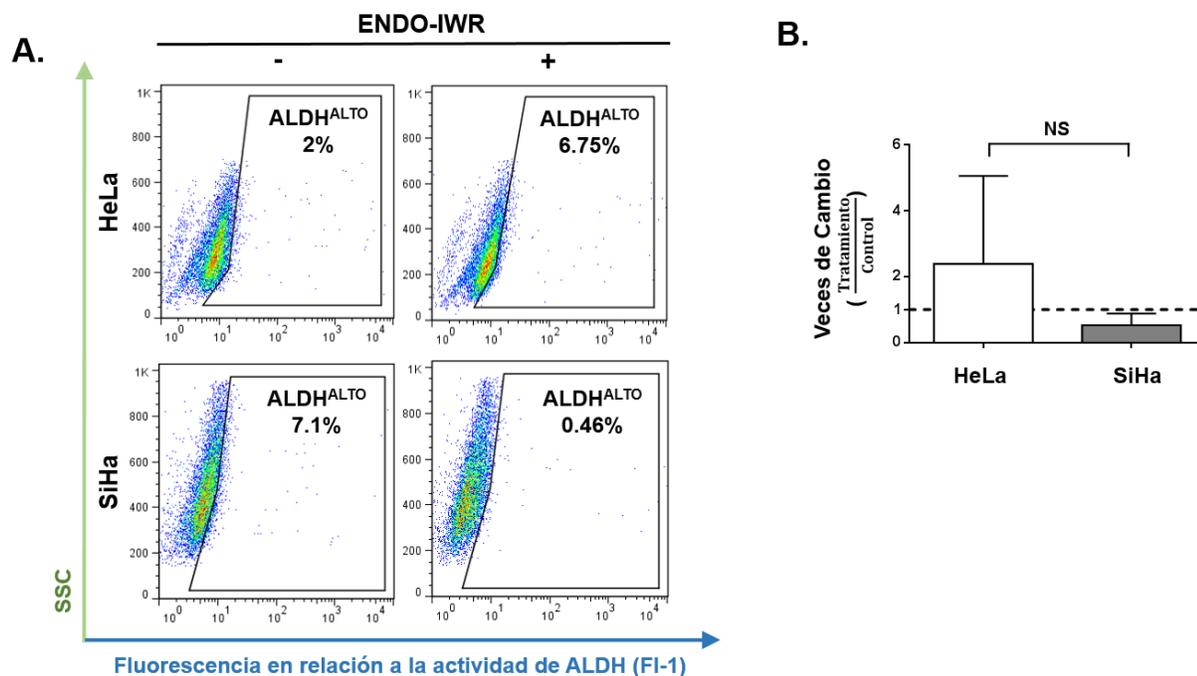


Figura 25. ENDO-IWR incrementa el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en cultivos en monocapa de HeLa, pero lo disminuye en SiHa. A. Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFLUOR™ de cultivos en monocapa sin tratamiento (-) y con 100 μ M de ENDO-IWR (+) de HeLa (paneles superiores) y SiHa (paneles inferiores). **B.** Cuantificación de las veces de cambio de la subpoblación ALDH^{ALTO} de las células con tratamiento (tratamiento) vs las células sin tratamiento (control). El gráfico de columna muestra el promedio \pm DE (n=7). La diferencia en las veces de cambio entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. NS representa diferencia no significativa con $p < 0.05$.

Finalmente, se evaluó el efecto de GSK3-IX y ENDO-IWR sobre el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en un cultivo de formación de esferas, debido a que en este cultivo se incrementa este porcentaje en HeLa y SiHa. Esto para conocer si en efecto, la vía WNT/ β -catenina se relaciona con las CTC de HeLa, pero no de SiHa, de acuerdo a lo observado en β -catenina nuclear en condiciones normales de esferas.

Como estrategia experimental, las células HeLa y SiHa fueron pre-tratadas con 5 μ M de GSK3-IX, o 100 μ M de ENDO-IWR, según el caso, durante 48 h en cultivos de monocapa. Al término del pre-tratamiento, las células se cultivaron en condiciones para la formación de esferas y se evaluó el enriquecimiento de las células ALDH^{ALTO} en el día 3, tiempo previamente establecido con mayor porcentaje de células ALDH^{ALTO}. Las veces de cambio en el porcentaje de las células ALDH^{ALTO} se calcularon dividiendo el porcentaje en las esferas de células con pre-tratamiento entre el porcentaje en las esferas de células sin pre-tratamiento (control).

En el caso de GSK3-IX, el pre-tratamiento con 5 μ M tuvo como resultado 0.45 ± 0.1 veces de cambio en HeLa, mientras que en SiHa fue de 4.41 ± 0.49 veces de cambio. Esto significó que, similar a lo observado en los cultivos de monocapa, el porcentaje de células ALDH^{ALTO} disminuyó en HeLa pero aumentó en SiHa, siendo esta diferencia entre ambas líneas celulares estadísticamente significativa (n=7; $p \leq 0.05$) (Fig. 26A, B)

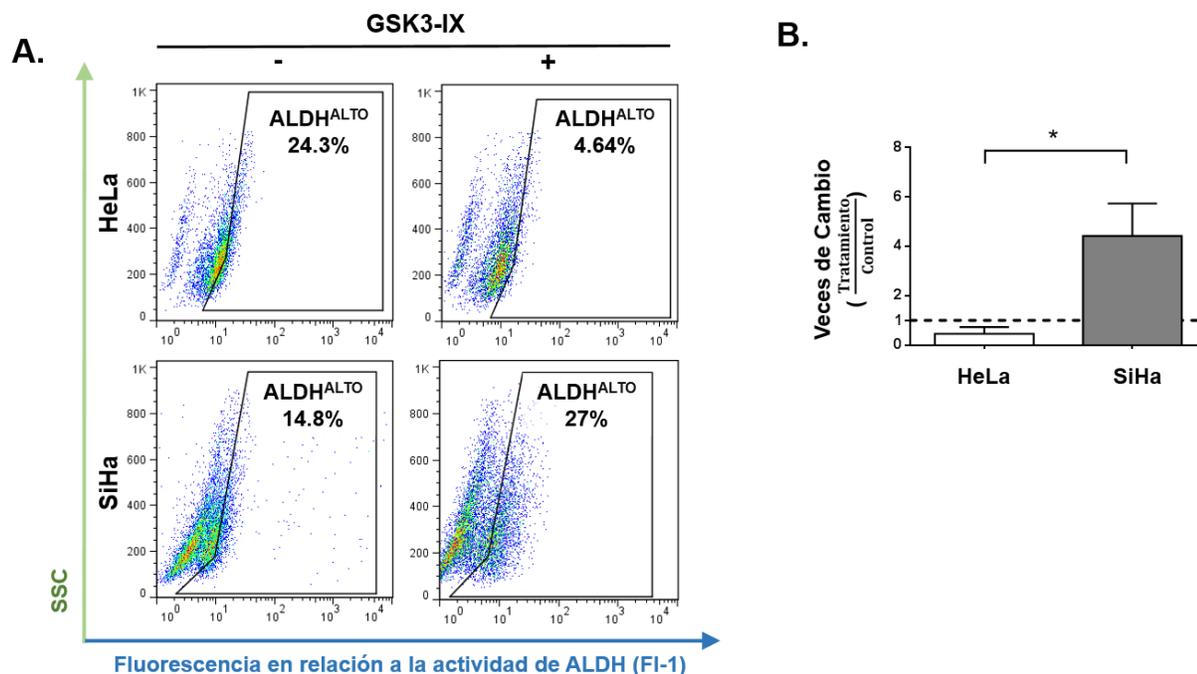


Figura 26. El pre-tratamiento de GSK3-IX disminuye el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en esferas de HeLa, mientras que lo aumenta en SiHa. A. Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFUOR™ de esferas formadas de células sin tratamiento (-) o con células tratadas con 5 μ M de GSK3-IX durante 48 h antes de la formación de esferas (+) de HeLa (paneles superiores) y SiHa (paneles inferiores). **B.** Cuantificación de las veces de cambio de la subpoblación ALDH^{ALTO} de las células con pre-tratamiento (tratamiento) vs las células sin tratamiento (control). El gráfico de columna muestra el promedio \pm DE (n=7). La diferencia en las veces de cambio entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

Respecto al pre-tratamiento con 100 μ M de ENDO-IWR, fue de 0.37 ± 0.13 las veces de cambio para HeLa y de 2.54 ± 0.68 para SiHa, reflejando una disminución de células ALDH^{ALTO} en HeLa, pero un aumento en SiHa. Estas veces de cambio fueron estadísticamente diferentes entre HeLa y SiHa, lo que mostró un efecto opuesto entre ambas líneas celulares (n=6; $p \leq 0.05$) (Fig. 27A, B). Estos datos resultaron interesantes porque además, ENDO-IWR llevó a un efecto opuesto respecto al cultivo en monocapa, es decir aumentó el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en el cultivo en monocapa pero lo disminuyó en esferas de células HeLa, mientras que esta misma molécula disminuyó el número de células ALDH^{ALTO} en el cultivo en monocapa pero aumentó en esferas de células SiHa, esto debido posiblemente a diferencias biológicas de cada línea celular para responder a cada clase de cultivo celular (Fig. 24A, B).

Por último, resultó interesante descubrir que el tratamiento con GSK3-IX tuviera un efecto opuesto en el porcentaje de las células ALDH^{ALTO} en HeLa y SiHa, tanto en cultivos de monocapa como en esferas formadas de células pre-tratadas, lo que nos condujo a estudiar a GSK3 β , que es el blanco directo de esta molécula. GSK3 β se encarga de las fosforilaciones de β -catenina para su posterior degradación, no obstante incluso GSK3 β también se regula por fosforilaciones en los residuos Y279 y Y216 para una mayor actividad de cinasa. Por esta razón, se evaluó esta forma fosforilada de GSK3 β , referida como p-GSK3 β , sin embargo es importante mencionar que el anticuerpo utilizado no solo reconoce a GSK3 β , sino también a GSK3 α , por lo que los resultados que se muestran hacen referencia a ambos. El cálculo de los niveles de p-GSK3 α/β se midió primero por citometría de flujo, cuyos resultados

mostraron que con el tratamiento de 1 y 2.5 μM de GSK3-IX, la fluorescencia en relación a p-GSK3 α/β disminuyó más en HeLa que en SiHa, siendo estadísticamente significativo solo para HeLa, aunque bajo la consideración de que se requieren de un mayor número de réplicas biológicas para corroborar esto ($n=3$; $p \leq 0.05$) (Fig. 28A, B). Posteriormente, se evaluaron los niveles de p-GSK3 α/β mediante Western Blot y, similar a los resultados del análisis por citometría de flujo, el tratamiento con GSK3-IX disminuyó p-GSK3 α/β en HeLa, pero no en SiHa (Fig. 28C). Estos resultados demostraron que, el tratamiento con GSK3-IX afectó diferencialmente los estados activos de GSK3 α/β , específicamente en referencia a sus fosforilaciones en los residuos Y279 y Y216, respectivamente, los cuales regulan sus actividades de cinasa.

Adicionalmente, también se evaluó si los niveles de p-GSK3 α/β pudieran cambiar por el tratamiento con ENDO-IWR, a pesar de no ser un blanco directo de la molécula. De acuerdo a lo observado por Western Blot, no hubo cambios en HeLa o SiHa (Fig. 28C), por lo que las diferencias entre HeLa y SiHa por ENDO-IWR no se debe a un efecto diferencial sobre estas fosforilaciones de GSK3 α/β .

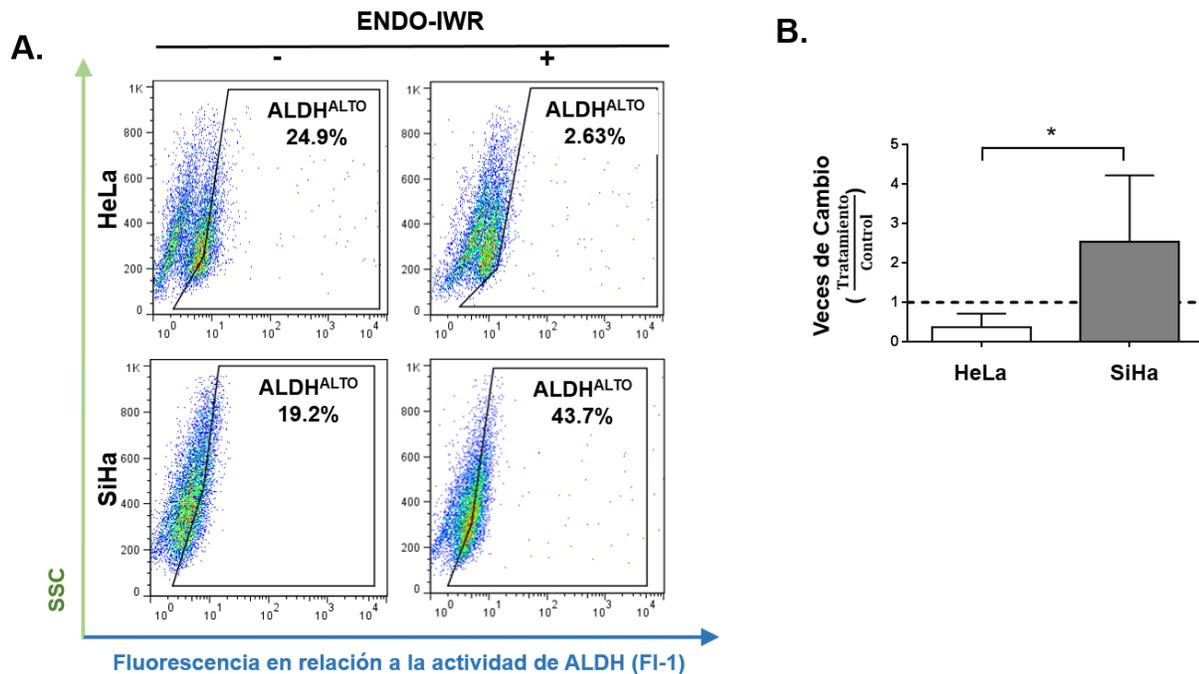


Figura 27. El pre-tratamiento de ENDO-IWR decremanta el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en esferas de HeLa, pero lo aumenta en SiHa. A. Diagramas representativos de citometría de flujo de células marcadas con el sistema ALDEFLUORTM de esferas formadas de células sin tratamiento (-) o con células tratadas con 100 μM de ENDO-IWR durante 48 h antes de la formación de esferas (+) de HeLa (paneles superiores) y SiHa (paneles inferiores). **B.** Cuantificación de las veces de cambio de la subpoblación ALDH^{ALTO} de las células con pre-tratamiento (tratamiento) vs las células sin tratamiento (control). El gráfico de columna muestra el promedio \pm DE ($n=6$). La diferencia en las veces de cambio entre HeLa y SiHa se determinó por la Prueba t de Student con Corrección de Welch. * representa significancia estadística con $p < 0.05$.

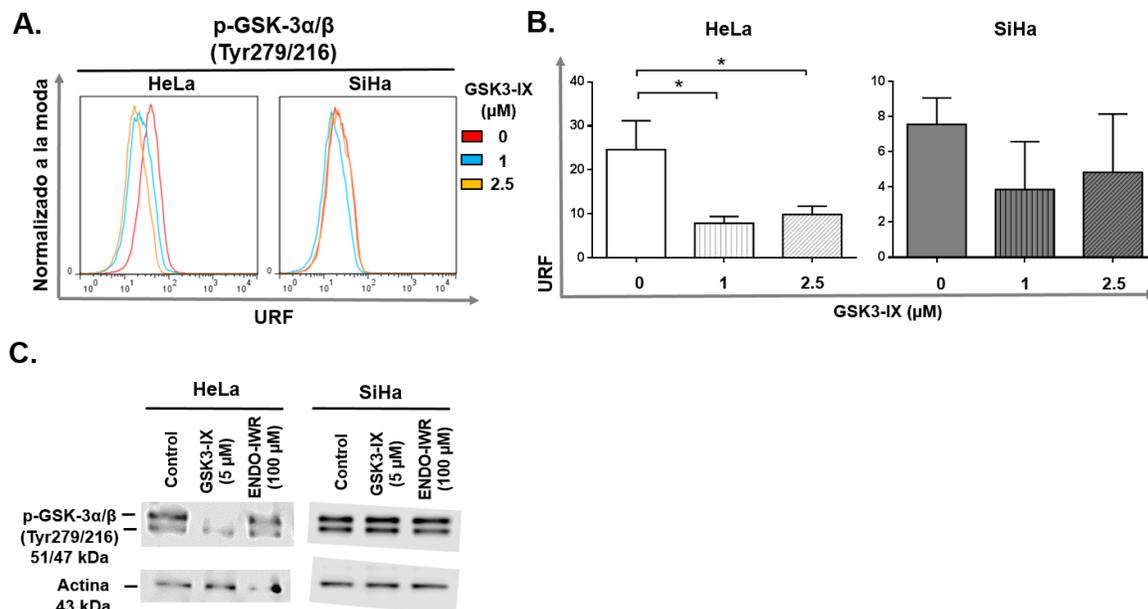


Figura 28. GSK3-IX disminuye la forma fosforilada de Y279/216 de GSK-3α/β más en HeLa que en SiHa. **A.** Histogramas superpuestos representativos de citometría de flujo de células HeLa (panel izquierdo) y SiHa (panel derecho) cultivadas en monocapa y teñidas contra p-GSK3α/β tras un tratamiento de 48 h a las concentraciones indicadas de GSK3-IX. **B.** Cuantificación de las URF en relación a p-GSK3 α/β en células HeLa y SiHa tratadas a las concentraciones indicadas de GSK3-IX (n=3). URF: Unidades Relativas de Fluorescencia. El gráfico de columna muestra el promedio ± DE. La diferencia en las URF se determinó por un Análisis de Varianza (ANOVA). * representa significancia estadística con $p < 0.05$. **C.** Western Blot representativo de p-GSK3α/β en extractos totales de HeLa y SiHa sin tratamiento (control), o con cada tratamiento indicado durante 48 h en cultivo de monocapa.

8. DISCUSIÓN

El cáncer representa un desafío en el campo clínico dada la heterogeneidad biológica que se presenta entre la diferentes células cancerosas, ya sean del mismo tumor o entre tumores. Dentro de esta heterogeneidad, las CTC son de interés, sin embargo se continúan describiendo sus características como las vías de señalización que las regulan, dentro de la cuales la vía WNT/β-catenina ha sido referente en distintos tipos de cáncer.

Nuestros resultados indicaron que las células HeLa y SiHa expresan β-catenina localizado en la membrana, el citoplasma y el núcleo en cultivos de monocapa, conforme a lo descrito en otros estudios (Zhang P 2014; Chakraborty C 2018). Aunque SiHa presentó mayores niveles de ABC a nivel total, no hubo diferencias en el núcleo, lo que sugiere una actividad basal de la vía WNT/β-catenina similar en ambas líneas celulares. Esto concuerda con los reportes previos, que detectaron actividad transcripcional mediada por β-catenina en HeLa y SiHa, utilizando el plásmido reportero TOP-Flash (Chen Q 2016; Li F 2015). La detección de dos subpoblaciones celulares, con diferentes niveles de β-catenina en células SiHa, se puede relacionar con la heterogeneidad celular que se presenta, aún en líneas celulares de cáncer (McGranahan N 2015; Jamal-Hanjani 2015)

En particular, β-catenina en el núcleo detectado en nuestros resultados es clave, ya que esta característica celular se asocia a una respuesta poco favorable a quimioterapia o radioterapia en

pacientes con Cacú, después de la operación quirúrgica (Zhang Y 2014; Bahrami A 2017, Mordhorst LB 2016). Incluso se describe que cerca del 70% de los tumores cervicales presentan β -catenina en el núcleo, lo que señala una activación de la vía WNT/ β -catenina, pero a diferencia de otros tipos de cáncer, las mutaciones en APC o β -catenina son raras en el Cacú, por lo que esta activación puede ser a otro nivel, como los receptores (Shinohara A 2001).

En el caso de los receptores FZD, su incremento se describe en diferentes tipos de cáncer, lo que sugiere que estos receptores pueden ser indicativos de una desregulación de la vía WNT/ β -catenina (Gurney A 2012). Previamente, se mostró que los transcritos de FZD2 y FZD10 aumentaron en tumores de Cacú, mientras que FZD7 disminuyó (Perez-Plasencia C 2008). Sin embargo, FZD7 es considerado relevante en el cáncer (Dann CE 2001), donde, la disminución de FZD7 llevó a una menor invasión y migración en células de Cacú. Además, en células HeLa y SiHa, la inhibición de FZD7 redujo la invasión y el EMT en condiciones *in vitro* (Deng B 2015). En nuestro trabajo, identificamos a una subpoblación celular FZD+, además de células FZD7+, aunque los bajos porcentajes sugieren que su presencia está restringida a solo unas pocas células en condiciones *in vitro*.

La expresión de FZD7 puede medirse por la misma vía WNT/ β -catenina, mediante sitios de unión para TCF en su promotor (Bhat V 2016). Sin embargo, en nuestros resultados, la subpoblación celular FZD7+ fue un porcentaje bajo, a pesar de que la mayoría de las células HeLa y SiHa tienen una actividad basal de la vía WNT/ β -catenina. La relación entre la vía WNT/ β -catenina y la expresión de FZD7 no siempre es evidente, ya que por ejemplo, en el cáncer colorectal, se observaron menores niveles de proteína de FZD7 en el frente invasivo de los tumores, a pesar de una alta actividad en la vía WNT/ β -catenina (Vincan E 2010) y esto puede deberse a que la transcripción de FZD7 también se regula por otras vías como la mediada por JAK/STAT3 o NOTCH (Bhat V 2016).

Por otra parte, no solo la presencia, sino el tipo de complejos multiproteicos que forma FZD7, dicta el tipo de señalización que se desencadena, dentro de los cuales LRP6 es un componente relevante (Bhat V 2016). Nuestros resultados mostraron la presencia de células FZD7+/LRP6+ en HeLa y SiHa, sugiriendo una participación conjunta. De manera interesante, también identificamos células solo con FZD7 o LRP6, lo que señala que cada uno puede tener funciones de manera independiente. Bajo esta idea, FZD7 no solo interactúa con otras proteínas, sino que puede homo-dimerizar o hetero-dimerizar con otros miembros de la familia FZD, dependiendo de la señal (Kaykas A 2004; Janda CY 2012). Esto implica que otros tipos de FZD pueden ser importantes en el Cacú, ya que nuestros resultados mostraron que las células FZD7+ fueron un menor porcentaje que las células FZD+, sugiriendo la existencia de células con otros tipos de FZD, dentro de los cuales FZD2 pudiera ser otro, ya que se identificó su sobre-expresión en líneas celulares y tumores derivados del Cacú en reportes previos (Perez-Plasencia C 2007; Frago-Ontiveros V 2012)

De manera importante, también identificamos a células con LGR5, el cual es una proteína transmembranal que interactúa y co-internaliza con receptores de WNT, como FZD; y que participa en la actividad transcripcional mediada por β -catenina en células HeLa y SiHa (Carmon KS 2012; Chen Q 2016). En nuestro trabajo, se identificó a una subpoblación celular FZD+/LGR5+, lo que sugiere que miembros de la familia FZD pueden funcionar junto a LGR5 para la señalización (De Lau W 2011). Además, las células LGR5+ pudieran presentar características de CTC, ya que esta proteína se propone como marcador de las CTC en el cáncer colorectal (Kemper K 2012). Tanto FZD como LGR5, resultaron estar restringidos a una subpoblación celular de bajo porcentaje en los cultivos en monocapa, característica asociada a las CTC en las líneas celulares, sin embargo mayores estudios se requieren para demostrar si en efecto, son posibles marcadores celulares de las CTC en el Cacú.

Nuestro análisis en cultivo de esferas, como método de enriquecimiento de las CTC, demostró el incremento de las células ALDH^{ALTO}, marcador de las CTC, en esferas tanto de HeLa como de SiHa, acorde a lo descrito anteriormente en nuestro grupo de trabajo (Ortiz-Sánchez E 2016). Esto también concuerda con otros modelos como en el cáncer de ovario, donde el transcrito de ALDH1A1 aumenta en esferas (Condello S 2015). El incremento de las células ALDH^{ALTO} fue similar entre HeLa y SiHa, posiblemente porque la actividad de ALDH no necesariamente depende del tipo de VPH, como lo descrito en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Keysar SB 2016) y en lugar de ello se debe a los factores de crecimiento en el cultivo de esferas, ya que por ejemplo al inhibir FGF1, se disminuye el porcentaje de células ALDH^{ALTO} en células de cáncer de pulmón (Ji W 2016).

La alta variación en los porcentajes de células ALDH^{ALTO} en HeLa y SiHa, tanto en monocapa como en esferas, también se observa en otras líneas celulares de Cacú, donde los porcentajes de células ALDH^{ALTO} oscilan del 1% al 52%, incluyendo a muestras de tumores primarios (van der Zee M 2015).

Es importante mencionar que, la subpoblación celular ALDH^{ALTO} detectada en nuestro trabajo, puede ser resultado de la actividad de uno o varios miembros de la familia de ALDH. Por ejemplo, en células de mesotelioma pleural maligno, la inhibición de ALDH1A3 redujo la subpoblación celular ALDH^{ALTO}, a diferencia de la inhibición de otros miembros como ALDH2, ALDH1A1 o ALDH1A3 (Canino C 2015), por lo que queda establecer qué miembros de la familia ALDH participan en la subpoblación celular ALDH^{ALTO} en células HeLa y SiHa, tanto en cultivos de monocapa como de esferas, aunque el más probable es que sea ALDH1A1, ya que se incrementa en un panel de líneas celulares de Cacú (Mamat S 2011).

En cuanto a los receptores de la vía WNT/ β -catenina, la subpoblación celular FZD⁺ también incrementó en los cultivos de esferas tanto en HeLa como en SiHa, similar a lo descrito en células de cáncer gástrico AGS, donde FZD7 aumenta en cultivos de esferas (Li G 2018). También en células de cáncer de ovario, los transcritos de FZD1, FZD4 y FZD7 aumentan en cultivos de esferas (Condello S 2015).

Dado que el porcentaje de las células FZD⁺ y las células ALDH^{ALTO} aumentó en el cultivo de esferas, parecía que ambos podrían identificar a la misma subpoblación celular, sin embargo nuestros resultados mostraron que son dos subpoblaciones celulares diferentes. A pesar de esto, no se descarta la posibilidad de que FZD identifique a las CTC en el Cacú, ya que las CTC pueden ser heterogéneas, incluso dentro de un mismo tumor, con diferentes firmas transcripcionales y patrones de expresión de marcadores celulares, tal y como se describe en otros tipos de cáncer (Moro M 2015; Boesch M 2014; Garner JM 2015), aunque se requieren de más estudios para demostrar si en efecto FZD sirve como marcador celular de las CTC en el Cacú.

En contraste, las células CTC (ALDH^{ALTO}) se relacionan con la vía WNT/ β -catenina en diversos modelos de estudio, como en las células de cáncer de próstata, donde el complejo β -catenina/TCF se une directamente al promotor de ALDH1A1 (Coloc M 2015). En células de carcinoma nasofaríngeo, TCF4 se une a este mismo promotor (Wang W 2017) e incluso en el cáncer de ovario, ALDH1A1 resultó ser un gen blanco de transcripción por β -catenina (Condello S 2015). Sin embargo, la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las células ALDH^{ALTO} no se ha descrito en el Cacú y con base a nuestros resultados, no es evidente para ambas líneas celulares, HeLa y SiHa, al menos en nuestras condiciones experimentales.

A pesar del incremento de las células ALDH^{ALTO} en los cultivos de esferas, la disminución de los niveles de β -catenina y ABC, tanto totales como en el citoplasma sugirió inicialmente una inactivación de la vía WNT/ β -catenina. La proteína β -catenina en el citoplasma se regula principalmente por su estabilización, lo cual puede favorecerse o inhibirse, dependiendo de las señales extracelulares e

intracelulares. De manera específica, β -catenina tiene 26 residuos de lisina, los cuales pueden ubiquitinarse por diferentes vías de señalización y llevar a su degradación vía proteosoma. El mecanismo más descrito y el cual se asocia a la vía WNT/ β -catenina, es la mediada por β -TrCP, que ubiquitina las lisinas 19 y 49 en β -catenina previamente fosforilada por GSK3 β y CKI α . Sin embargo, otras proteínas como SIAH1, ubiquitina a β -catenina en las lisinas 660 y 671 en una vía dependiente de p53 (Liu J 2001); o la proteína JADE1, que también ubiquitina a β -catenina de manera similar a β -TrCP, pero sin una regulación mediada por los ligandos WNT (Tauriello DV 2010; Chitalia VC 2008).

Además de las ubiquitinaciones, las fosforilaciones también forman parte de las modificaciones postraduccionales de β -catenina que regulan su estabilización, como las mediadas por CK2 en T393, o PKA en S675 (Song DH 2003; Hino S 2005). A pesar de que las fosforilaciones y ubiquitinaciones están estrechamente relacionadas, son dos procesos que pueden regularse de manera independiente, ya que por ejemplo, en células de fibrosarcoma, la proteína c-FLIP-L inhibe la ubiquitinación y degradación de β -catenina, después de la fosforilación por GSK3 β (Naito M 2004). Dado que los niveles de ABC también disminuyeron en nuestros resultados, sugiere que GSK3 β es parte del mecanismo que reduce los niveles de β -catenina en el citoplasma en las esferas de HeLa y SiHa.

Si bien, la estabilidad de β -catenina en el citoplasma es regulado por distintos factores, también los niveles de β -catenina dentro del núcleo se regulan. Acorde a nuestros resultados, parece que β -catenina en el núcleo se regula de manera diferencial entre HeLa y SiHa, ya que mientras se incrementó en HeLa, disminuyó en SiHa, en cultivos de esferas.

En los cultivos de esferas, una de las vías que se activa es la mediada por EGFR, la cual tras la unión de EGF, puede activar la vía RAF/MEK/ERK o la vía PI3K/AKT. Específicamente, EGF puede incrementar β -catenina nuclear, a través de AKT (Ma L 2013), ya sea de forma directa al fosforilar la S552 de β -catenina, lo que lleva a su disociación de las uniones célula-célula (Fang D 2007), o indirecta, al fosforilar la S9 de GSK3 β , inactivándola y evitando las fosforilaciones de β -catenina que la llevan a la ubiquitinación (He XC 2007). Pese a esto, es posible que la diferencia de β -catenina en el núcleo entre esferas de HeLa y SiHa visto en el presente trabajo, sea debido al estado de metilación del gen APC (Song Y 2009), porque mientras está metilado en HeLa, lo que favorecería la activación de la vía WNT/ β -catenina; está desmetilado en SiHa, inhibiendo esta misma vía en el núcleo. Esto porque APC no solo es importante para la fosforilación y degradación de β -catenina en el citoplasma, sino también en el núcleo. Estudios en células de cáncer de colon mostraron que, APC se localiza en el núcleo y media el transporte núcleo-citoplasma de β -catenina para controlar su degradación (Henderson BR 2000; Rosin-Arbesfeld 2000). Además, algunos autores proponen que APC también inhibe la actividad transcripcional de β -catenina, a través de CtBP, que es un represor transcripcional que se une a proteínas como TCF. También se propone que APC se une a β -catenina dentro del núcleo para alejarlo de los genes blancos, o incluso el complejo APC/CtBP puede competir por el mismo sitio de unión con el complejo β -catenina/TCF, inhibiendo así la activación transcripcional (Hamada F and Bienz M 2004; Sierra J 2006). No obstante, el presente trabajo no evaluó la actividad transcripcional mediada por β -catenina, por lo que queda por conocer si la diferencia en el enriquecimiento de β -catenina nuclear en las esferas de HeLa y SiHa, también se refleja en una diferencia transcripcional de los genes blancos.

Es pertinente señalar que, las células en un cultivo de esferas muestran diferentes perfiles de expresión genética (Cody NAL 2008), cambios en la señalización intercelular específica (Gaedtker L 2007) y están sujetos a diferentes fuerzas mecánicas (Ingber DE 2006) en comparación a un cultivo en monocapa; por lo que cambios en mecanismos moleculares propios de la formación de esferas pueden ocultar o evidenciar la posible relación de la vía WNT/ β -catenina con las células ALDH^{ALTO}. Es por esto

que, en la última parte del presente trabajo se evaluó el efecto de inhibir o activar la vía WNT/ β -catenina en los porcentajes de las células ALDH^{ALTO} en cultivos de monocapa, y estimar si esta tendencia se mantenía bajo la formación de esferas.

El efecto de activar la vía WNT/ β -catenina, mediante el uso de GSK3-IX, en el porcentaje de células ALDH^{ALTO} fue opuesto entre las células HeLa y SiHa, disminuyendo en HeLa y aumentando en SiHa, tanto en monocapa como en esferas. Esta diferencia puede deberse a, cambios en el mecanismo molecular por el cual GSK3-IX actúa sobre GSK3 α/β en cada línea celular y/o diferencias biológicas propias de las células HeLa y SiHa.

Para el primer punto, nuestros resultados mostraron que la activación de GSK3 α/β , evaluada por la forma fosforilada (Y279/Y216), disminuyó en HeLa pero no en SiHa, tras el tratamiento con GSK3-IX. Esto sugiere que, GSK3-IX puede llevar a una diferente inactivación en GSK3 α/β , dependiendo de la línea celular, lo que puede reflejarse en un efecto como en el porcentaje de células ALDH^{ALTO}.

Para el segundo punto, el papel de GSK3 β en la relación de la vía WNT/ β -catenina con las células ALDH^{ALTO} puede afectarse por distintos componentes celulares. GSK3 β no solo regula a β -catenina para su degradación, sino regula otros componentes de la vía WNT/ β -catenina como APC, aumentando la afinidad de APC por β -catenina (Ha NC 2004). Dada la diferencia en la metilación de APC entre HeLa y SiHa, es posible que la regulación de GSK3 β en la vía WNT/ β -catenina, a través de APC, sea diferente. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con GSK3-IX, tuvo un efecto similar en la relocalización y en el aumento en los niveles de la proteína β -catenina en HeLa y SiHa, lo que señala que la diferencia del efecto de GSK3-IX en el porcentaje de células ALDH^{ALTO}, es por un mecanismo independiente de β -catenina.

Esta independencia en la señalización entre GSK3 β y β -catenina se observa en estudios sobre la tumorigenicidad, donde la regresión del cáncer solo se alcanzó al inhibir GSK3 β y β -catenina en CTC de leucemia (Fung TK 2012). Parte de esta independencia es porque, GSK3 β también fosforila otros sustratos como: c-JUN (de Groot R 1993), c-MYC (Sears R 2000) y Ciclina D1 (Rubinfeld B 1996) para regular su degradación. Además, GSK3 β entra al núcleo en algunos tipos de cáncer, donde regula a NF- κ B (Ougolkov A 2006) o modificaciones de histonas (Ougolkov A 2007). Esto resulta clave para explicar nuestros resultados, pues los promotores de ALDH1A1 y ALDH1A3 tienen posibles elementos de respuesta a NF- κ B, lo que abre la posibilidad de que GSK3 β pueda regular al marcador celular ALDH, por un mecanismo independiente de β -catenina, a través de NF- κ B. Este posible mecanismo podría explicar parte del por qué la inhibición de GSK3 α/β disminuyó el porcentaje de las células ALDH^{ALTO}, como observamos en nuestro trabajo con las células HeLa. La disminución del porcentaje de células ALDH^{ALTO} al inhibir GSK3 α/β también se ha observado en células de cáncer de próstata PC-3, solo que en este caso utilizaron la molécula GIN para la inhibición. En este mismo reporte, y de manera notable, no se describen cambios en otras líneas celulares de cáncer de próstata como: C4-3B4 y DU-145 (Kroon J 2014), lo que demuestra que las células pueden presentar diferentes respuestas biológicas a pesar de provenir de un mismo tipo de cáncer, haciendo referencia a la heterogeneidad inter-tumoral que existe en el campo del cáncer.

También es importante tener en mente que la inhibición de GSK3 β puede ser específico para cada miembro de la familia ALDH. Por ejemplo, la inhibición de GSK3 β en células PC3 incrementa el transcrito de ALDH2, pero disminuyen los transcritos de ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A, ALDH7A1 y ALDH9A1 (Kroon J 2014), haciendo que en nuestros resultados quede por esclarecer los cambios en cada miembro de la familia ALDH en HeLa y SiHa, bajo la inhibición de GSK3 β con la molécula GSK3-IX.

En relación a la inhibición de la vía WNT/ β -catenina, utilizando la molécula ENDO-IWR, nuestros resultados mostraron cambios opuestos en el porcentaje de células ALDH^{ALTO} entre HeLa y SiHa, aumentando en HeLa pero disminuyendo en SiHa. Los cambios opuestos entre HeLa y SiHa involucran en primer lugar a la proteína AXINA, blanco de ENDO-IWR. Se considera que la concentración intracelular de AXINA es un factor limitante para el complejo de fosforilación y degradación de β -catenina. No obstante, AXINA también favorece la ubiquitinación y degradación de β -catenina al unirse a WDR26.

Es importante mencionar que, en nuestro trabajo no se detectaron cambios evidentes en los niveles de β -catenina tras el tratamiento con ENDO-IWR en las células HeLa, lo que sugiere que componentes celulares propios de HeLa evitan un decremento de β -catenina mediado por AXINA, contrario a lo observado en SiHa, lo que explica en parte, efectos opuestos en el porcentaje de células ALDH^{ALTO}.

Además, de manera similar a lo discutido para GSK3 β , AXINA puede regular el marcador celular ALDH por mecanismos independientes de β -catenina, ya que siendo una proteína de andamiaje con dominios RGS, DIX y de unión a PP2A, participa en otros mecanismos moleculares como la vía mediada por JNK (Zhang Y 1999) o la vía de TGF- β (Furuhashi M 2001). Respecto a éste, TGF- β inhibe la expresión de ALDH1 en un modelo de carcinoma gástrico (Katsuno Y 2012). En referencia al Cacu, se observa en muestras de pacientes y en la línea celular HEC-1, que las células con la forma activa de SMAD3, proteína efectora de TGF- β , no expresan la proteína ALDH1, pero lo más interesante resulta de que en presencia de NODAL, miembro de la superfamilia de TGF- β , la proteína ALDH1 se degrada vía proteosoma (Wang Y 2013). Por lo tanto, esta vía representa un mecanismo molecular por el cual ENDO-IWR, a través de Axina, podría tener un efecto en el enriquecimiento de las células ALDH^{ALTO}, de manera independiente a β -catenina.

Otra explicación a los efectos opuestos tras el tratamiento con ENDO-IWR, es que el gen *axina* tenga mutaciones que genere distintas respuestas en la traducción de la señal, aunque estas mutaciones no se describen en el Cacu, sino mayoritariamente en los carcinomas hepatocelulares (Sato S 2000). No obstante, se describe una hipermetilación en las islas CpG en el promotor de *axina*, por lo que cambios discretos en los niveles de la proteína, mediados por ENDO-IWR, pueden llevar a efectos celulares distintos (Yang HJ 2006)

8.1 HeLa vs SiHa

Las diferencias entre las células HeLa y SiHa, a lo largo de nuestros resultados, principalmente se deben a factores intrínsecos que dan como resultado diferentes respuestas bajo un mismo estímulo, como un cultivo de esferas o la presencia de un agente exógeno. Se ha observado que los transcritos diferencialmente expresados son 2,069 en SiHa y 5,295 en HeLa, en comparación al epitelio cervical normal, lo que confirma características biológicas específicas para cada línea celular (Vazquez-Mena O 2012). Esto debido al subtipo del cáncer del cual se originaron, el estadio del cáncer del cual fueron obtenidos, diferencias en los sitios de integración del genoma de VPH o el tipo de VPH que tiene cada una (Tabla I). De estos factores, el más estudiado es la diferencia respecto al tipo de VPH. Los tipos VPH16 y VPH18 expresan las mismas proteínas, pero las propiedades bioquímicas de las proteínas virales cambian de un tipo a otro tipo de VPH. Por ejemplo, la habilidad de E6 de formar un complejo con p53 es diferente entre VPH16 y VPH18 (Werness BA 1990) o E2 que puede actuar como represor transcripcional en VPH18, o como activador transcripcional en VPH16 (Dowhanick JJ 1995; Kovelman R 1996) señalando que diferencias a nivel molecular pueden estar detrás de otras diferencias biológicas en condiciones *in vitro* o *in vivo*, como la capacidad de transformación (Chakrabarti O 2004) o en este estudio, la respuesta a un agente exógeno en las CTC, evaluadas por la actividad de ALDH.

VPH16 y VPH18 comparten la dependencia de un repertorio de factores transcripcionales (Bernard HU 2002), pero no se descarta que cambios en la secuencia de nucleótidos en cada uno puedan ser de significancia funcional (Veress G 1999), como lo descrito en la diferencia de eficiencias de immortalización, que se deben principalmente a diferencias en las regiones reguladoras de la transcripción de E6 y E7 (Romanczuk H 1991). En específico, estas regiones reguladoras están en el LCR, el cual exhibe diferente actividad transcripcional dependiendo si es VPH16 o VPH18, justificado en parte porque el nivel de identidad de LCR entre VPH16 y VPH18 es alrededor del 19% (Ottinger M 2009).

Otra posible causa de las diferencias biológicas entre HeLa y SiHa observadas en nuestros resultados, es el número de copias del ADN de VPH en cada línea celular, ya que HeLa tiene de 10-50 copias mientras que SiHa tiene de 1-2 copias (Baker C 1987). Sin embargo, el número de copias del ADN de VPH no necesariamente refleja diferencias biológicas, ya que por ejemplo, CaSki con 500 copias y SiHa con 1-2 copias inhiben el crecimiento mediado por p53 de manera similar, y entonces las diferencias se deban principalmente a los tipos de VPH, pues en este mismo estudio, HeLa con un tipo de VPH diferente, fue más susceptible a la inhibición del crecimiento (Ahn WS 2002).

Respecto a los mecanismos moleculares de la célula, también se regulan distinto dependiendo del tipo de VPH, en particular entre VPH16 o VPH18, dentro de los cuales, el más descrito es la señalización desencadenada por TGF- β , que disminuye la viabilidad, inhibe el potencial de membrana mitocondrial y arresta el crecimiento en G₀/G₁ en SiHa, mientras que no afecta a HeLa (Thacker PC 2015).

Estos cambios en los mecanismos moleculares pueden ser más complejos de entender, al comparar los cultivos en monocapa con los cultivos de esferas, como se evaluó en el presente trabajo, ya que los patrones de expresión de las proteínas de VPH cambian en relación a la diferenciación celular, capacidad que se afecta desigual en el cultivo de monocapa y en el cultivo de esferas (Doorbar J 2012). En particular, para los cultivos de esferas, EGF pudiera producir distintas respuestas dependiendo del tipo de VPH. Esto porque, TGF- α , miembro de la familia de EGF, inhibe más el crecimiento en células con VPH16 que en células con VPH18, en un modelo de queratinocitos del prepucio humano immortalizados (Villa LL 1991). Además de que, otros factores que actúan a través del receptor de EGF, como TNF, lleva al arresto del crecimiento de las células con VPH16, pero no a las células con VPH18, en un modelo similar al reporte anterior (Termini L 2008). Esto en parte, porque E5 regula al receptor de EGF (Crusius K 1998; Iida K 2011) y porque LCR tiene elementos de respuesta a EGF, regulando positiva o negativamente a E6 y E7, dependiendo del tipo de célula y el tipo de VPH (Yasumoto S 1991; Peto M 1995). Por lo tanto, los factores de crecimiento en los cultivos de esferas, en particular EGF, pueden tener señalizaciones diferentes entre las células HeLa y SiHa.

Para interés de nuestro trabajo, es importante la relación que se establece entre el VPH y la vía WNT/ β -catenina, el cual se ha corroborado en distintos reportes. Las proteínas del VPH favorecen, principalmente, la estabilización de β -catenina al interferir con el complejo de fosforilación y ubiquitinación de β -catenina o inhibiendo su degradación por proteosoma (Sominsky S 2014). Pero también, por ejemplo, E6 aumenta la transcripción de los genes blancos de β -catenina, al interactuar con DVL2 y β -catenina (Bonilla-Delgado J 2012) o incrementa los niveles de FOXM1, a través de MZF1/NKX2-1, lo cual promueve la localización nuclear de β -catenina (Chen PM 2014). Por su parte, E7 se une a la subunidad catalítica PP2A, inhibiendo su actividad y contribuyendo indirectamente a la estabilización de la proteína β -catenina (Pim D 2005).

Tabla I. Comparación entre HeLa y SiHa

	HeLa	SiHa	Referencia
Año de origen	1951	1970	Gey G 1952; Friedl F 1970
Histología	Adenocarcinoma	Carcinoma de células escamosas	Gey G 1952; Friedl F 1970
Estadio^A	SD	II	Magaldi TG 2011
Tipo de VPH	18	16	Gey G 1952; Friedl F 1970
Número de copias de VPH	50-100	1-2	Gey G 1952; Friedl F 1970
Sensibilidad al efecto antiproliferativo de TGF-β1	Bajo	Intermedio	Thacker PC 2015
Genes^B con mayor expresión por TGF-β1	<i>fzd2, fzd4, wisp2</i>	<i>ldlr</i>	Kloth JN 2005
Genes^B con menor expresión por TGF-β1	<i>sfrp4, dkk1</i>	-	Kloth JN 2005
^{MC} Células FZD⁺/LGR5⁺	+	+	Chen Q 2016; Presente Tesis
^{MC} Células FZD7⁺/LRP6⁺	+	+	Deng B 2015; Presente Tesis
^{MC} Células ALDH^{ALTO}	+	+	Ortiz-Sánchez E 2016; Presente Tesis
^{ESF} Células FZD⁺	Incremento*	Incremento*	Presente Tesis
^{ESF} Células ALDH^{ALTO}	Incremento*	Incremento*	Ortiz-Sánchez E 2016; Presente Tesis
^{MC, ESF} Localización de β-catenina	Membrana, citoplasma y núcleo	Membrana, citoplasma y núcleo	Zhang P 2014; Chakraborty C 2018; Presente Tesis
^{ESF} Niveles de β-catenina citoplasmática/membranal	Decremento*	Decremento*	Presente Tesis
^{ESF} Niveles de β-catenina nuclear	Incremento*	Decremento*	Presente Tesis
^{MC} Células ALDH^{ALTO} por tratamiento con GSK3-IX	Decremento**	Incremento**	Presente Tesis
^{MC} Células ALDH^{ALTO} por tratamiento con ENDO-IWR	Incremento**	Decremento**	Presente Tesis
^{ESF} Células ALDH^{ALTO} por tratamiento con GSK3-IX	Decremento**	Incremento**	Presente Tesis
^{ESF} Células ALDH^{ALTO} por tratamiento con ENDO-IWR	Decremento**	Incremento**	Presente Tesis
Sensibilidad a GSK3-IX en la fosforilación en Y279/216 de GSK3α/β	Intermedio	Bajo	Presente Tesis

^A De acuerdo al Sistema de Estadificación FIGO

^B Genes relacionados con la vía WNT/ β -catenina

^{MC} Condición de cultivo en monocapa

^{ESF} Condición de cultivo en esferas

* Cambios en comparación al cultivo en monocapa

** Cambios en comparación al cultivo sin tratamiento

(-) No Detectado

(+) Detectado

SD: Sin Determinar

9. CONCLUSIONES

La activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina es uno de los mecanismos moleculares más referidos en el campo del cáncer, y en años más recientes, en la biología de las CTC. Así como se ha descrito la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC en diferentes tipos de cáncer, la hipótesis de la presente tesis fue que esta misma relación también se daría en el Cacú. Sin embargo, los resultados mostraron que esta relación no fue evidente en las dos líneas celulares de Cacú empleadas en el presente trabajo, HeLa y SiHa; ya que a pesar de que ambas presentaron componentes propios de esta vía, incluyendo a β -catenina, los cambios en la activación de la vía WNT/ β -catenina no se relacionaron directamente con los porcentajes de CTC (ALDH^{ALTO}), siendo incluso opuesto entre HeLa y SiHa para ciertas condiciones experimentales (Tabla I).

Esto resalta que para establecer la relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC en el Cacú, se debe tomar en cuenta la heterogeneidad inter-tumoral que parece ser clave en entender dicha relación, como lo son las diferencias en los tipos de VPH, que tiene una gran relevancia por encargarse de infectar a las células que originarán a las células cancerosas. Además, las subpoblaciones celulares distinguidas por componentes de la vía WNT/ β -catenina, lleva a considerar también a la heterogeneidad intra-tumoral, replanteando entonces que tanto la heterogeneidad inter-tumoral como intra-tumoral son importantes para entender las relaciones que pudieran establecerse en el Cacú entre distintas vías de señalización y la subpoblación celular de CTC.

Por tanto el panorama se complica más de lo que ya plantea el Modelo de Plasticidad, porque para establecer la relación entre la vía WNT/ β -catenina, y posiblemente otras vías de señalización, con las CTC debe tomarse en cuenta las características específicas propias de cada paciente con Cacú.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados mostrados en la presente tesis sugieren que factores adicionales influyen en establecer una relación entre la vía WNT/ β -catenina y las CTC (ALDH^{ALTO}) en el Cacú, quizás como resultado de la dinámica entre las células dentro de un mismo cultivo celular, por lo que estrategias experimentales adicionales y complementarias, como las que se plantean a continuación, permitirían hacer una mejor aproximación a esto:

- a) La transfección de células HeLa y SiHa con un plásmido reportero TOPflash, permitirá darle seguimiento a las células con actividad transcripcional mediada por β -catenina y comparar cambios entre las células en un mismo cultivo o entre monocapa y esferas, dado que β -catenina nuclear no necesariamente lleva a la transcripción de los genes blancos y por tanto a una función biológica.
- b) La purificación de la subpoblación de CTC (ALDH^{ALTO}) permitirá especificar la activación de la vía WNT/ β -catenina en estas células en particular.
- c) La sincronización del ciclo celular en los cultivos permitirá conocer si diferencias en el rango de proliferación celular están detrás de las subpoblaciones celulares identificadas por componentes de la vía WNT/ β -catenina, ya que se describe que β -catenina depende del ciclo celular (Olmeda D 2003).
- d) El análisis por microscopía de lapso de tiempo en un cultivo celular de células transfectadas con TOPflash y en presencia del reactivo *Aldefluor* permitirá conocer si en efecto, la activación de la vía WNT/ β -catenina lleva a un fenotipo ALDH^{ALTO}, si la relación es inversa o si existe algún tipo de retroalimentación entre ambos.

e) La inclusión en estos estudios con líneas celulares de Cacu sin VPH o con otros tipos de VPH, permitirá conocer la influencia de este factor en la relación que pudiese establecerse entre la vía WNT/ β -catenina y las células ALDH^{ALTO}.

f) La inclusión en estos estudios a partir de cultivos primarios de Cacu mostrará si los resultados del presente trabajo también se cumplen en modelos celulares más cercanos al campo clínico, dado que se argumenta que las líneas celulares divergen de lo observado en los tumores de pacientes (Carlson MW 2007; Sandberg R & Ernberg I 2005).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn WS (2002). "Differential suppression of human cervical cancer cell growth by adenovirus delivery of p53 in vitro: arrest phase of cell cycle is dependent on cell lines." J Cancer Res **93**(9):1012-1019.

Al-Hajj M (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci USA **100**(7):3983-3988.

Anastas JN (2013). "Wnt signaling pathways as therapeutic targets in cancer." Nat Rev Cancer **13**:11-26.

Armstrong L (2004). "Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity." Stem Cells **22**(7): 1142-1151.

Ashihara K (2002). "Mutation of beta-catenin gene in endometrial cancer but not in associated hyperplasia." Med Electron Microsc **35**(1):9-15.

Bahrami A (2017). "Clinical significance and prognosis value of WNT signaling pathway in cervical cancer." J Cell Biochem **118**:3028-3033.

Baker CC (1987). "Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines." J Virol **61**:962-97.

Bello JO (2015). "Regulation of the Wnt/ β .Catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins." Viruses **7**(8):4734-4755.

Benedet JL (2003). "Carcinoma of the cervix uteri." International Journal of Gynaecology and Obstetrics **83**(Suppl1): 41-78.

Bernard HU (2002). "Gene expression of genital human papillomavirus and considerations on potential antiviral approaches." Antivir Ther **7**:219-37.

Bhanot P (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wngless receptor." Nature **382**:225-230.

Bhat V (2016). "Notch-induced expression of FZD7 requires noncanonical NOTCH3 signaling in human breast epithelial cells." Stem Cells Dev **25**:522-529.

Boesch M (2014). "The side population of ovarian cancer cells defines a heterogeneous compartment exhibiting stem cell characteristics." Oncotarget **5**: 7027-7039.

Bonilla-Delgado J (2012). "The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/ β -catenina pathway in skin epidermis in vivo." Mol Cancer Res **10**:250-258.

Bonnet D & Dick JE (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nature Med **3**:730-737.

Borovski T (2011). "Cancer stem cell niche: the place to be." Cancer Res **71**:634-639.

Bosch FX (2003). "Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality." J Natl Cancer Inst Monogr **31**:3-13.

Bosch FX (2013). "Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases." Vaccine **31**(Suppl 8): 1-31.

Bruce WR & Van Der Gaag H (1963). "A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo." Nature 79-80.

Burchell AN (2006). "Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection." Vaccine **24**(Suppl 3):S3/52-61.

Burd EM (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." Clin Microbiol Rev **16**(1):1-17.

Burrell RA (2013). "The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution." Nature **501**:338-345.

Calabrese C (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." Cancer Cell **11**:69-82.

Calvet CY (2014). "The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment." PLoS One **9**(2):e89644.

Campbell PJ (2010). "The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer." Nature **467**:1109-1113.

Canino C (2015). "A STAT3-NFkappa B/DDIT3/CEBPbeta axis modulates ALDH1A3 expression in chemoresistant cell subpopulations." Oncotarget **6**(14):12637-12653.

Carlson MW (2007). "Quantitative gene expression assessment identifies appropriate cell line models for individual cervical cancer pathways." BMC Genomics **8**:117.

Carmon KS (2011). "R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling." Proc Natl Acad Sci USA **108**(28):11452-11457.

Carmon KS (2012). "LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/ β -catenina signaling." Mol Cell Biol **32**(11):2054-2064.

Cavard C (2008). "Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology." Future Oncol **4**:647-660.

Chaffer CL (2011). "Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state." Proc Natl Acad Sci USA **108**(19):7950-7955.

Chaichana K (2006). "Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies." Stem Cells **24**:2851-2857.

Chakrabarti O (2004). "Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic ras." J Virol **78**(11):5934-5945.

- Chakraborty C (2018). "Activation of Wnt-beta-catenin pathway in basal-parabasal layers of normal cervical epithelium comparable during development of uterine cervical carcinoma." Mol Cell Biochem **443**(1-2):121-130.
- Chan F (1999). "A common human skin tumour is caused by activating mutations in β -catenin." Nature Genet **21**:410-143.
- Chan PK (2010). "Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies." Int J Cancer **126**(1): 297-301.
- Charafe-Jauffret E (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer." Clin Cancer Res **16**:45-55.
- Charles N (2010). "Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells." Cell Stem Cell **6**:141-152.
- Chen PM (2014). "Up-regulation of FOXM1 by E6 oncoprotein through the MZF1/NKX2-1 axis is required for human papillomavirus-associated tumorigenesis." Neoplasia **16**:961-971.
- Chen Q (2014). "LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/beta-catenin signaling pathway." Oncotarget **5**(19):9092-9105.
- Chen Q (2016). "EZH2-mediated repression of GSK-3beta and TP53 promotes Wnt/beta-catenin signaling-dependent cell expansion in cervical carcinoma." Oncotarget **7**(24):36115-36129.
- Chen W (2003). "Dishevelled 2 recruits beta arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." Science **301**:1391-1394.
- Chitalia VC (2008). "Jade-1 inhibits Wnt signaling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by Pvh1." Nat Cell Biol **10**(10):1208-1216.
- Chung MT (2009). "Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer." Gynecol Oncol **112**:301-306.
- Clarke MF (2006). "Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Research **66**(19):9339-9344.
- Clarkson B (1970). "Studies of cellular proliferation in human leukemia. 3. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of 3H-thymidine for 8 or 10 days." Cancer **25**:1237-1260.
- Clevers H (2014). "Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control." Science **346**:1248012.
- Cody NAL (2008). "Influence of monolayer, spheroid and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines." BMC Medical Genomics. **1**:34.
- Collins AT (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**:10946-10951.
- Coloc M (2015). "Aldehyde dehydrogenase is regulated by b-catenin/TCF and promotes radioresistance in prostate cancer progenitor cells." Cancer Res **75**(7):1482-1494.

- Condello S (2015). "Beta-catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids." Oncogene **34**:2297-2308.
- Correa S (2012). "Wnt/b-catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia." BMC Cancer **12**:303-313.
- Crusius K (1998). "The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT." Exp Cell Res **241**:76-83.
- Dalerba P (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." Annu Rev Med **58**:267-284.
- Dann CE (2001). "Insight into Wnt binding and signaling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." Nature **412**(6842):86-90.
- De Boer CJ (1999). "Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix." Am J Pathol **155**:505-515.
- De Groot R (1993). "Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy." Oncogene **8**:841-847.
- De La Coste A (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci USA **95**:8847-8851.
- De Lau W (2011). "Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signaling." Nature **476**:293-297.
- Deng B (2015). "Downregulation of Frizzled-7 expression inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cell lines." Medical Oncology (Northwood, Londo, England) **32**:102.
- Dontu G (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." Genes Dev **17**(10):1253-1270.
- Doorbar J (2012). "The biology and life-cycle of human papillomaviruses." Vaccine **30**Suppl 5:F55-70.
- Dowhanick JJ (1995). "Supression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein." J Virol **69**(12):7791-7799.
- Driessens G (2012). "Defining the mode of tumour growth by clonal analysis." Nature **488**:527-530.
- Durst M (1987). "Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas." Proc Natl Acad Sci USA **84**:1070-1074.
- Eppert K (2011). "Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia." Nature Med **17**:1086-1093.
- Eramo A (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ **15**:504-514.
- Fadare O (2005). "E-cadherin and beta-catenin expression in early stage cervical carcinoma: A tissue microarray study of 147 cases." World J Surg Oncol **3**:38.
- Fang D (2007). "Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity." J Biol Chem **282**(15):11221-11229.

- Feng D (2009). "Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri." Oncol Rep **22**(5):1129-1134.
- Fialkow PJ (1976). "Clonal origin of human tumors." Biochim Biophys Acta **458**(3):283-321.
- Fragoso-Ontiveros V (2012). "Gene expression profiles induced by E6 from non-european HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis." Virology **432**:81-90.
- Franceschi S (2006). "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide." Int J Cancer **119** (11):2677-84.
- Fulawka L (2014). "Cancer stem cells-the current status of an old concept: literatures review and clinical approaches." Biol Res **47**(1):66.
- Fung TK (2012). "Selective treatment of mixed-lineage leukemia leukemic stem cells through targeting glycogen synthase kinase 3 and the canonical Wnt/beta-catenin pathway." Curr Opin Hematol **19**(4):280-286.
- Furuhashi M (2001). "Axin facilitates Smad3 activation in the Transforming Growth Factor beta signaling pathway." Mol Cell Biol **21**:5132-5141.
- Gaedtke L (2007). "Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells." J Proteome Res **6**(11): 4111-4118.
- Garland S (2007). "Cervical Cancer and HPV Vaccination." N Eng J Med **356**:1915-1927.
- Garner JM (2015). "Molecular heterogeneity in a patient-derived glioblastoma xenograft is regulated by different cancer stem cell populations." PLoS One **10**(12):e0145052.
- Gerlinger M (2012). "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing." N Engl. J. Med **366**:883-892.
- Giles RH (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." Biochim Biophys. Acta **1653**:1-24.
- Ginestier C (2007). "ADLH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5):555-567.
- Glinka A (1998). "Dickopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**:357-362.
- Greenspan EJ (2011). "Ibuprofen inhibits activation of nuclear beta-catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK3-beta." Cancer Prev Res **4**:161-171.
- Gupta PB (2011). "Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells." Cell **146**:633-644.
- Gurney A (2012). "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors." Proc Natl Acad Sci USA **109**:11717-11722.
- Gustafsson L (1997). "International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening." Int J Cancer **71**(2):159-65.

Hamada F and Bienz M (2004). "The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear b-catenin from TCF." Dev Cell **7**:677-685.

Hanahan D & Weinberg RA (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Henderson BR (2000). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates b-catenin subcellular localization and turnover." Nat Cell Biol **2**:653-660.

Heppner GH (1978). "Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor." Cancer Res **38**:3758-3763.

Heppner GH (1984). "Tumor heterogeneity." Cancer Res **44**:2259-2265.

He TC (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**:1509-1512.

Hewitt HB (1958). "Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukemia of CBA mice." Br J Cancer **12**:378-401.

He XC (2007). "PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis." Nature Genetics **39**:189-198.

Hino S (2005). "Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination." Mol Cell Biol **25**(20):9063-72.

Holah NS (2017). "Evaluation of the role of ALDH1 as cancer stem cell marker in colorectal carcinoma: An immunohistochemical study." J Clin Diagn Res **11**:EC17-EC23.

Hovanes K (2001). "Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer." Nat Genet **28**:53-57.

Huang EH (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colom tumorigenesis." Cancer Res **89**:3382-9.

Huang Z (2015). "Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells." Oncotarget **6**(37):39550-39563.

Hubbard SA (2009). "Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma." Cancer Res **69**(21):8241-8248.

Ichizawa K (2010). "Tumor-initiating cells are rare in many humn tumors." Cell Stem Cell **7**(3):279-282.

Iida K (2011). "EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EFGR pathway a novel therapeutic target." Br J Cancer **195**(3):420-427.

Iliopoulos D (2011). "Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancers via IL6 secretion." Proc Natl Acad Sci USA **108**(4):1397-1402.

Im SS (2002). "New developments in the treatment of invasive cervical cancer." Obstetrics and Gynecology Clinics of North America **29**:645-687.

Imura J (2001). "Beta-catenin expression as a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma." Int J Mol Med **8**(4):353-358.

Itasaki N (2003). "Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signaling." Development **130**:4295-4305.

- Jamal-Hanjani M (2015). "Translational implications of tumor heterogeneity." Clin Cancer Res **21**:1258-1266.
- Janda CY (2012). "Structural basis of Wnt recognition by Frizzled." Science **337**:59-64.
- Jiang F (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer." Mol Cancer Res **7**:330-338.
- Jing J (2014). "Embryonic stem cell markers Sox-2 and OCT4 expression and their correlation with WNT signal pathway in cervical squamous cell carcinoma." Int J Clin Exp Pathol **7**(5):2470-2476.
- Ji W (2016). "FGFR1 promotes the stem cell-like phenotype of FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells through the Hedgehog pathway." Oncotarget **7**(12):15118-15134.
- Johnston MD (2010). "On the proportion of cancer stem cells in a tumour" J Theor Biol **266**(4):708-711.
- Junttil MR (2013). "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." Nature **501**(7467):346-354.
- Katsuno Y (2012). "Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF-beta." J Pathol **228**:391-404.
- Kaykas A (2004). "Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization." Nat Cell Biol **6**:52-58.
- Kemper K (2012). "Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells." Stem Cells **30**(11):2378-2386.
- Keysar SB (2016). "Regulation of Head and Neck squamous cancer stem cells by PI3K and SOX." J Natl Cancer Inst **109**(1). pii:djw189.
- Kikuchi A (2011). "New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation." Int Rev Cell Mol Biol **291**: 21-71.
- Killmann SA (1963). "Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labeling in human beings in vivo with tritiated thymidine." Lab Invest **12**:671-684.
- Kim RJ. (2013). "High aldehyde dehydrogenase activity enhances stem cell features in breast cancer cells by activating hypoxia-inducible factor-2alpha." Cancer Letter **333**(1):18-31.
- Kim SM (2005). "Multinuclear giant cell formation is enhanced by down-regulation of Wnt signaling in gastric cancer cell line, AGC." Exp Cell Res **308**(1):18-28.
- Kioussi C (2002). "Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development." Cell **111**:673-85.
- Kirikoshi H (2001). "Expression of WNT14 and WNT14B mRNAs in human cancer, up-regulation of WNT14 by IFNgamma and up-regulation of WNT14B by beta-estradiol." Int J Oncol **19**(6): 1221-5.
- Kirikoshi H (2002). "Expression and regulation of WNT10B in human cancer: up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by beta-estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid." Int J Mol Med **10**(4):507-11.

- Klarmann GJ (2013). "Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer." Epigenetics **3**:59-63.
- Koestenbauer S (2006). "Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells." Am J Reprod Immunol **55**:169-180.
- Kondo T (2004). "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line." Proc Natl Acad Sci USA **101**(3):781-786.
- Kovelman R (1996). "Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomavirus." J Virol **70**(11):7549-7560.
- Kreso A (2013). "Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer." Science **339**(6119):543-548.
- Krivtsov AV (2006). "Transformation from committed progenitor to leukemia stem cell initiated by MLL-AF9." Nature **442**:818-822.
- Kroon J (2014). "Glycogen synthase kinase-3beta inhibition depletes the population of prostate cancer stem/progenitor-like cells and attenuates metastatic growth." Oncotarget **5**(1):8986-8994.
- Kryczek I (2012). "Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells." Int J Cancer **130**:29-39.
- Laird PW (2005). "Cancer epigenetics." Hum Mol Genet **14** Spec No 1:R65-R76.
- Lammi L (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." Am. J. Hum. Genet. **74**:1043-50.
- Larue L (2006). "The WNT/beta-catenin pathway in melanoma." Front Biosci **11**:733-742.
- Lee EJ (2009). "Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin." Int J Cancer **124**:287-297.
- Levina V (2010). "Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop." Cancer research **70**:338-346.
- Li C (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**:1030-1037.
- Li F (2015). "SOX14 promotes proliferation and invasion of cervical cancer cells through WNT/ β -catenin pathway." Int J Clin Exp Pathol **8**(2):1698-1704.
- Li G (2018). "Frizzled7 promotes epithelial to mesenchymal transition and stemness via activating canonical Wnt/ b-catenin pathway in gastric cancer." Int J Biol Sci **14**(3):280- 293.
- Li L (1999). "Axin and Frat interact with DVL and GSK, linking Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1." EMBO J **18**:4233-4240.
- Lin L (2014). "Wnt5A expression is associated with the tumor metastasis and clinical survival in cervical cancer." **7**(9):6072-8.
- Li T (2010). "ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome." Lab Invest **90**:234-244.

- Liu B (2004). "The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells." Proc Natl Acad Sci. USA **101**:4158-4163.
- Liu H (2013). "Single-cell clones of liver cancer stem cells have the potential of differentiating into different types of tumor cells." Cell Death Dis **4**:e857.
- Liu J (2001). "Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein." Mol Cell **7**(5):927-936.
- Li Y & Littera J (2012). "Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes?" Cancer Res **72**:576-580.
- Loeb LA (2011). "Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting." Nat Rev Cancer **11**(6), 450-457.
- Logan CY (2004). "The WNT signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**:781-810.
- López J (2012). "Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance." BMC Cancer **12**:48.
- MacDonald BT (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell **17**:9-26.
- Magee JA (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity and uncertainty." Cancer Cell **21**:283-296.
- Ma L (2013). "Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/beta-catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma." FEBS J **280** (9):2027-2041.
- Malanchi I (2008). "Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signaling." Nature **452**:650-653.
- Mamat S (2011). "Transcriptional regulation of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 gene by alternative spliced forms of nuclear factor Y in tumorigenic population of endometrial adenocarcinoma." Genes Cancer **2**(10):979-84.
- Mani SA (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**:704-715.
- Mao J (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." Mol Cell **7**:801-809.
- Mao Y (2013). "Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer." Cancer Metastasis Rev **32**:303-315.
- Marcato P (2011). "Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform." Cell Cycle **10**:1378-1384.
- Marcato P (2015). "Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling." Mol Oncol **9**:17-31.
- Marusyk A (2012). "Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?" Nat Rev Cancer **12**(5):323-334.
- Marx J (2003). "Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer." Science **301**:1308-1310.

Mazieres J (2004). "Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer." Cancer Res **64**:4717-4720.

McGranahan N (2015). "Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution." Cancer Cell **27**:15-26.

Meacham CE (2013). "Tumor heterogeneity and cancer cells plasticity." Nature **501**:328-337.

Mehlen P & Puisieux A (2006). "Metastasis: a question of life or death." Nat Rev Cancer **6**(6):449-458.

Miyoshi Y (1992). "Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene." Hum Mol Genet **1**:229-233.

Miyoshi Y (1998). "Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon3." Cancer Res **58**:2524-2527.

Mogbeli M (2013). "Cancer stem cell markers in esophageal cancer." Am J Cancer Sci **2**(1):37-50.

Moon HS (2003). "The expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin/ catenin adhesion complex, and focal adhesion kinase in invasive cervical carcinomas." Int J Gynecol Cancer **13**(5):640-646.

Mordhorst LB (2016). "Prognostic impact of the expression of Wnt- signaling proteins in cervical carcinoma FIGO stage I-IV treated with radiotherapy or chemotherapy." Oncotarget **39**:63042-63053.

Moreb JS (2008). "Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells." Curr Stem Cell Res Ther **3**:237-246.

Moro M (2015). "Treatment with all-trans retinoic acid prevents cisplatin-induced enrichment of CD133+ tumor-initiating cells and reveals heterogeneity of Cancer Stem Cell compartment in lung cancer." J Thorac Oncol **10**:1027-1036.

Moscicki AB (2006). "Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer." Vaccine **24**(Suppl 3): S3/42-51.

Munemitsu S (1996). "Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein." Mol Cell Biol **16**:4088-4094.

Muzio G (2012). "Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation." Free Radical Biol Med **52**:735-746.

Naito M (2004). "Cellular FLIP inhibits beta-catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling." Mol Cell Biol **24**:8418-8427.

Navin N (2010). "Inferring tumor progression from genomic heterogeneity." Genome Res **20**:68-80.

Navin N (2011). "Tumor evolution inferred by single-cell sequencing." Nature **472**:90-94.

Nihers C (2012). "The complex world of WNT receptor signaling." Nat Rev Mol Cell Biol **13**: 767-779.

Nowell PC (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**:23-28.

Nusse R (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell **31**:99-109.

- Old LJ (2007). "Cancer is a somatic cell pregnancy." Cancer Immun **7**:19.
- Olmeda F (2003). "Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis." Mol Biol Cell **14**(7):2844-60.
- Ortiz-Sánchez E (2016). "Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression." Oncotarget **7**(22):31943-31954.
- Oskarsson T (2011). "Breast cancer cells produce tenascin C as metastatic niche component to colonize the lungs." Nat Med **17**:867-874.
- Ottinger M (2009). "Cell-type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2." Virology **395**(2):161-171.
- Ougolkov A (2007). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells." Blood **110**:735-742.
- Pardal R (2003). "Applying the principles of stem cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**:895-902.
- Park SY (2010). "Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to invasive phenotype." J Clin Invest **120**:636-644.
- Patel AP (2014). "Single-cell RNA-seq highlights intratumor heterogeneity in primary glioblastoma." Science **344**:1396-1401.
- Pectasides D (2008). "Chemotherapy for recurrent cervical cancer." Cancer Treat Rev **34** (7): 603-613.
- Pereira F (1991). "The 56 kDa androgen binding protein is an aldehyde dehydrogenase." Biochem Biophys Res Commun **175**:831-838.
- Perez-Plasencia C (2007). "Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer. Identification of altered metabolic pathway." Infect Agent Cancer **2**:16.
- Perez-Plasencia C (2008). "Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway." Int Arch Med **1**(1):10.
- Peto M (1995). "Epidermal growth factor induction of human papillomavirus type 16 E6/E7 mRNA in tumor cells involves two AP-1 binding sites in the viral enhancer." J Gen Virol **76** (Pt 8): 1945-1958.
- Pim D (2005). "Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A." Oncogene **24**:7830-7838.
- Pinson KI (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signaling in mice." Nature **407**:535-538.
- Polakis P (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15):1837-1851.
- Ponti D (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." Cancer Res **65**:5506-5551.
- Prosperi JR (2010). "A Wnt-ow of opportunity: targeting the Wnt/beta-catenin pathway in breast cancer." Curr Drug Targets **11**:1074-1088.

- Quintana E (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222):593-598.
- Quintana E (2010). "Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized." Cancer Cell **18**:510-523.
- Raha D (2014). "The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation." Cancer Res **74**(13):3579-3590.
- Ramachandran I (2012). "Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo." Oncogene **31**:2725-2737.
- Ramos-Solano M (2015). "Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration." **335**(1):39-50.
- Rath G (2015). "Clinical significance of inactivated glycogen synthase kinase 3beta in HPV-associated cervical cancer. Relationship with Wnt/beta-catenin pathway activation." Am J Reprod Immunol **73**:460-478.
- Reya T (2001). "Stem cells, cancer and cancer stem cells." Nature **414**:105-111.
- Reynolds BA and Weiss S (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**:1707-1710.
- Ricci-Vitiani L (2007). "Identification and expansion of human colon cancer-initiating cells." Nature **445**:111-115.
- Rodriguez-Sastre MA (2005). "Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix." Gynecol Oncol **97**(2):330-336.
- Romanczuk H (1991). "The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18." J Virol **65**(5):2739-2744.
- Rosen JM and Jordan CT (2009). "The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm." Science **324**:1670-1673.
- Rosin-Arbesfeld R (2000). "The APC tumour suppressor has a nuclear export function." Nature **406**:1009-1012.
- Rubinfeld B (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." Science **272**:1023-1026.
- Saavedra KP (2012). "Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix." Clinical Epigenetics **4**(1):1-7.
- Saeki H & Sugimachi K (2001). "Carcinogenic Risk Factors." JMAJ **44**(6):245-249.
- Sánchez-Barriga JJ (2012). "Mortality trends from cervical cancer in the seven socioeconomic regions and the thirty two federative entities of México, 2000-2008." Gac Med Mex **148**(1):42-51.
- Sandberg R & Ernberg I (2005). "Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI)." Proc Natl Acad Sci USA **102**(6):2052-2057.

- Satoh S (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." Nat Genet **24**:245-250.
- Schepers AG (2012). "Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas." Science **337**:730-735.
- Schnier JB (1999). "Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a favopiridol-binding protein." FEBS Lett **454**:100-104.
- Schuh A (2012). "Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns." Blood **120**:4191-4196.
- Schwitalla S (2013). "Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties." Cell **152**:25-38.
- Sears R (2000). "Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability." Genes Dev **14**:2501-2514.
- Sell S & Pierce GB (1994). "Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers." Lab Invest **70**:6.
- Shah SP (2009). "Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution." Nature **461**:809-813.
- Shah SP (2012). "The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers." Nature **486**:395-399.
- Shao C (2014). "Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway." Clin Cancer Res **20**:4154-4166.
- Sharma SV (2010). "A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations." Cell **141**:69-80.
- Shim C (1998). "Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array." Clin Cancer Res **4**:3045-3050.
- Shinohara A (2001). "Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix." Gynecol Oncol **82**(3):450-455.
- Shtutman M (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." Proc Natl Acad Sci USA **96**:5522-5527.
- Sierra J (2006). "The APC tumor suppressor counteracts b-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes." Genes and Dev **20**:586-600.
- Silva IA (2011). "Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival." Cancer Res **71**:3991-4001.
- Singh SK (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **3**:5821-5828.
- Sládek NE (1999). "Aldehyde dehydrogenase-mediated relative insensitivity to the oxazaphosphorines." Curr Pharm Des **5**:607-625.

- Sládek NE (2003). "Human aldehyde dehydrogenase: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact." J Biochem Mol Toxicol **17**(1):7-23.
- Smart CE (2013). "In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mamospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity." PLoS One **8**(6):e64388.
- Sominsky S (2014). "HPV16 and E6AP differentially cooperate to stimulate or augment Wnt signaling." Virology **468-470**:510-523.
- Song DH (2003). "CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling." J Biol Chem **278**(26):24018-24025.
- Song Y (2009). "Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression." Cancer Chemother Pharmacol **63**(4):605-613.
- Sophos NA and Vasiliou V (2003). "Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update." Chem Biol. Interact **143-144**:5-22.
- Southam C (1962). "Autologous and homologous transplantation of human cancer. In Biological interactions in normal and neoplastic growth: a contribution to the tumor-host problem." MJ Brennan and WL Simpson, eds (Boston: Little, Brown) 723-738.
- Southam CM & Brunschwig A (1961). "Quantitative studies of autotransplantation of human cancer." Cancer **14**:971-978.
- Staal FJ (2008). "WNT signaling in the immune system: WNT is spreading its wings." Nat Rev Immunol **8**:581-593.
- Stewart JM (2011). "Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian-initiating cells." Proc Natl Acad Sci USA **108**:6468-6473.
- Stiehl T (2017). "Stem cell self-renewal in regeneration and cancer: Insights from mathematical modeling." Current Opinion in Systems Biology **5**:112-120.
- Storms RW (1999). "Isolation of primitive human hematopoietic progenitor on the basis of aldehyde dehydrogenase activity." Proc Natl Acad Sci USA **96**:9118-9123.
- Sugihara E (2013). "Complexity of cancer stem cells." Int J Cancer **132**(6):1248-1259.
- Sun XX (2012). "Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment." Acta Pharmacol **36**(10):1219-1227.
- Su Y (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**:327-337.
- Takebe N (2015). "Targeting Notch, Hedgehog and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update." Nat Rev Clin Oncol **12**:445-464.
- Taipale J & Beachy PA (2001). "The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer." Nature **411**:349.
- Tamai K (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**:530-535.
- Tamai K (2004). "A mechanism for Wnt correceptor activation." Mol Cell **13**:149-156.

- Tammela T (2017). "A Wnt-producing niche drives proliferative potential and progression in lung adenocarcinoma." Nature **545**:355-359.
- Tao Q (2005). "Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos." Cell **120**:857-871.
- Tauriello DV (2010). "The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation." Cell Cycle **9**(18):3700-3709.
- Termini L (2008). "Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment." BMC Med Genomics **1**:29.
- Tetsu O & McCormick F (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**:422-426.
- Thacker PC (2015). "Curcumin and emodin down-regulates TGF-beta signaling pathway in human cervical cancer cells." PLoS One **10**(3):e0120045.
- Tirino V (2013). "Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization." FASEB J **27**(1):13-24.
- Todaro M (2010). "Evidences of cervical cancer stem cells derived from established cell lines". Cell Cycle **9**(7):1238-1249.
- Vaillant F (2008). "The mammary progenitor marker CD61/ β 3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis." Cancer Res **68**:7711-7717.
- Valent P (2012). "Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details." Nat Rev Cancer **12**(11):767-775.
- Van de Putte G (2004). "E-cadherin and catenins in early squamous cervical carcinoma." Gynecol Oncol **94**(2):521-527.
- Van der Zee M (2015). "IL6/KA1/STAT3 signaling blockade in endometrial cancer affects the ALDH hi/CD126+ Stem-like component and reduces tumor burden." Cancer Research **75**(17):3608-3622.
- Vazquez-Mena O (2012). "Amplified genes may be overexpressed, unchanged or downregulated in cervical cancer cell lines." PLoS One **7**(3):e32667.
- Veress G (1999). "Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16." J Gen Virol **80**:1035-1043.
- Vermeulen L (2010). "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment." Nat Cell Biol **12**:468-476.
- Villa LL (1991). "Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region." Virology **181**:374-377.
- Vincan E (2010). "Variable FZD7 expression in colorectal cancers indicates regulation by the tumour microenvironment." Dev Dyn **239**(1):311-317.
- Vinnitsky VB (1993). "Oncogerminative hypothesis of tumor formation." Med Hypotheses. **40**:19-27.
- Voeller HJ (1998). "Beta-catenin mutations in human prostate cancer." Cancer Res **58**:2520-2523.

- Vogelstein B (1993). "The multistep nature of cancer." Trends in genetics **9**:138-141.
- Walboomers JM (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**:12-19.
- Walter MJ (2012). "Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia." N. Engl. Med **366**:1090-1098.
- Wang W (2017). "NOR1 suppresses cancer stem like cells properties of tumor cells via the inhibition of the AKT-GSK-3beta-Wnt/beta-catenin-ALDH1A1 signal circuit." J Cell Physiol **232**(10):2829-2840.
- Wang Y (2013). "Inhibitory effect of Nodal on the expression of aldehyde dehydrogenase 1 in endometroid adenocarcinoma of uterus." Biochem Biophys Res Commun **440**(4):731-736.
- Wei H (2014). "Clinical significance of Wnt-11 and squamous cell carcinoma antigen expression in cervical cancer." Med Oncol **31**(5):933.
- Wei H (2016). "Wnt-11 overexpression promoting the invasion of cervical cancer cells." Tumour Biol **37**(9):11789-11798.
- Wend P (2010). "Wnt signaling in stem and cancer stem cells." Seminars in cell & developmental biology **21**:855-863.
- Werness BA (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 proteins with p53." Science **248**:76-79.
- Wicha MS (2006). "Cancer stem cells: an old idea- a paradigm shift." Cancer Res **66**(4): 1883-1890.
- Wong HC (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." Mol Cell.**12**:1251-1260.
- Xu X (2012). "Single cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor." Cell **148**:886-895.
- Yang HJ (2006). "Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinic-pathological data." BMC Cancer **6**:212.
- Yang M (2018). "Wnt signaling in cervical cancer?" **9**(7):1277-1286.
- Yan K (2014). "Glioma cancer stem cells secrete Gremlin 1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy." Genes Dev **28**:1085-1100.
- Yasumoto S (1991). "Epidermal growth factor (EGF) elicits down-regulation of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6/E7 mRNA at the transcriptional level in an EGF-stimulated human keratinocyte cell line: functional role of EGF-responsive silencer in the HPV-16 long control region." J Virol **65**(4):2000-2009.
- Yuzugullu H (2009). "Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells." Mol Cancer **8**:90.
- Zhang S (2008). "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors." Cancer Res **68**:4311-4320.
- Zhang Y (1999). "Axin forms a complex with MEKK1 and activates c-Jun NH2-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase through Domains distinct from Wnt signaling." J Biol Chem **274**:35247-35254.

Zhang Y (2014). "Nuclear localization of beta-catenin is associated with poor survival and chemo-/radioresistance in human cervical squamous cell cancer." Int J Clin Exp Pathol **7**:3908-3917.

Zhou J (1997). "Binding of thyrozine analogs to human liver aldehyde dehydrogenase." Eur J Biochem **245**: 123-128.

Zhu AJ & Watt FM (1999). "b-catenin signaling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion." Development **126**:2285-2298.

Zurawel RH (1998). "Sporadic medulloblastoma contain oncogenic beta-catenin mutations." Cancer Res **58**:896-899.