



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis del estado funcional del receptor c-Met y su
relación con la troncalidad e invasividad en líneas celulares
de cáncer gástrico”**

T E S I S

Que presenta

LIC. EN BIOL. CLAUDIA IVETTE RUGERIO MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis

DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ

DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

Ciudad de México

Agosto, 2016

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 CÁNCER.....	3
3.2 EI ESTÓMAGO	5
3.3 CÁNCER GÁSTRICO	7
3.4 CÉLULAS TRONCALES.....	11
3.4.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA AUTORENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA	13
3.5 CÉLULAS TRONCALES GÁSTRICAS	13
3.6 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	15
3.7 INVASIÓN Y METÁSTASIS.....	20
3.8 EL RECEPTOR c-Met.....	23
3.9 LA VIA DE SEÑALIZACION HGF/c-Met	24
3.10 TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA	27
3.11 MARCADORES DE EMT	29
4. ANTECEDENTES	33
5. JUSTIFICACIÓN	36
6. HIPÓTESIS	37
7. OBJETIVO GENERAL.....	37
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
9. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	38
10. METODOLOGÍA.....	39

10.1	LINEAS CELULARES	39
10.1.2	CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA.....	39
10.1.3	CULTIVO CELULAR EN ESFERAS	40
10.2	MARCAJE PARA CITOMETRÍA CD44, CD24 Y CD54.	41
10.3	MARCAJE PARA CITOMETRIA NANOG Y OCT4	42
10.4	MARCAJE PARA CITOMETRÍA c-Met y p-Met	42
10.5	ENSAYO DE CLONOGENICIDAD.....	43
10.6	ENSAYO SCRATCH.....	43
10.7	ENSAYO DE INVASIÓN	44
10.8	ESTADISTICA.....	44
11	RESULTADOS	45
11.1	ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS TIPO TRONCAL (MARCADOR CD44 ^{high}) EN LA LÍNEA CELULAR AGS	45
11.2	EVALUACIÓ DEL ESTADO FUNCIONAL DEL RECEPTOR c-Met EN CULTIVOS ENRIQUECIDOS DE GCSC.....	48
11.3	EVALUACIÓN DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR c-Met Y LA TRONCALIDAD DE LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN GCSC.....	51
11.4	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TUMORIGÉNICO Y CAPACIDAD DE INVASIÓN DE LAS GSCS DERIVADAS DE LAS LÍNEAS CELULARES AGS Y NCI-N87.	55
11.4.1	ENSAYO CLONOGÉNICO	55
11.4.2	ENSAYO DE MIGRACIÓN	61
11.4.3	ENSAYO DE MIGRACIÓN	64
12	DISCUSIÓN	66
13	CONCLUSIONES.....	73

14 PERSPECTIVAS	74
15 FIGURAS SUPLEMENTARIAS	75
16 BIBLIOGRAFÍA	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características principales del Cáncer	5
Figura 2. División anatómica y composición celular de las unidades gástricas del antro	6
Figura 3. Incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer a nivel mundial	8
Figura 4. Autorenovación y diferenciación en SC	11
Figura 5. Generación secuencial de células epiteliales gástricas a partir de células troncales gástricas.....	14
Figura 6. Hipótesis de CSCs.....	16
Figura 7. Procesos de metástasis.....	22
Figura 8. Estructura del receptor c-Met.....	23
Figura 9. La vía de señalización c-Met	25
Figura 10. Transición EMT.....	28
Figura 11. Marcadores de EMT	29
Figura 12. Esferas CD44+ de la línea celular NCI-N87.	33
Figura 13. Capacidad tumorigénica de las células SGC7901 <i>in vivo</i>	34
Figura 14. Expresión relativa de c-Met en línea celular AGS y NCI-N87 de CaG.	35
Figura 15. El receptor c-Met inactivo en la línea celular AGS.....	35
Figura 16. Estrategia experimental planteada..	38
Figura 17. Monocapa de la línea celular AGS y NCI-N87.....	39
Figura 18. Mayor porcentaje de células CD44 ^{high} obtenido al 3º día de cultivo en esfera para la línea celular AGS a través de citometría de flujo	46
Figura 19. Enriquecimiento de células CD44 ^{high} al tercer día de cultivo de formación de esferas.	46
Figura 20. Esfera de la línea celular AGS al tercer día de enriquecimiento del marcador CD44 ^{high}	47
Figura 21. Esfera de la línea celular NCI-N87 al tercer día de enriquecimiento del marcador CD44 ^{high}	47

Figura 22. Estado funcional del receptor c-Met en la línea celular AGS en cultivo en monocapa y esfera	48
Figura 23. Dot-plot de la población c-Met y p-Met en un cultivo en monocapa (A) y un cultivo en esfera (B) de la línea celular AGS.....	49
Figura 24. Estado funcional del receptor c-Met en la línea celular AGS en cultivo en monocapa y esfera.	50
Figura 25. Dot-plot de la población c-Met y p-Met en un cultivo en monocapa (A) y un cultivo en esfera (B) de la línea celular NCI-N87	50
Figura 26. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met en esferas de la línea celular AGS	51
Figura 27. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met en esferas de la línea celular NCI-N87.....	52
Figura 28. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Nanog en la línea celular AGS	53
Figura 29. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Oct4 en la línea celular AGS	53
Figura 30. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Nanog en la línea celular NCI-N87	54
Figura 31. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Oct4 en la línea celular AGS	55
Figura 32. Colonia formada a partir de un cultivo en monocapa de la línea celular AGS.....	56
Figura 33. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (vehículo) de la línea celular AGS.....	58
Figura 34. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (inhibidor) de la línea celular AGS.....	58
Figura 35. Análisis del ensayo clonogénico para la línea celular AGS	59
Figura 36. Ensayo clonogénico en un cultivo en monocapa de la línea celular NCI-N87	59
Figura 37. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (inhibidor) de la línea celular NCI-N87.....	60

Figura 38. Análisis del ensayo clonogénico para la línea celular NCI-N87	60
Figura 39. Control negativo del cierre de herida	61
Figura 40. Ensayo scratch de la monocapa de la línea celular AGS	62
Figura 41. Análisis de ensayo scratch	62
Figura 42. Ensayo scratch de células derivadas de un cultivo en esfera de la línea celular AGS con vehículo	63
Figura 43. Ensayo scratch de células derivadas de un cultivo en esfera de la línea celular AGS con inhibidor de c-Met.....	64
Figura 44. Control positivo y negativo del ensayo de invasión..	65
Figura 45. Ensayo de invasión de la línea celular AGS..	65
Figura 46. Análisis del ensayo de migración de la línea celular AGS..	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores fenotípicos de troncalidad de GCSC en CaG.....	19
Tabla 2. Marcadores de superficie asociados a resistencia en CaG.	20
Tabla 3. Medio de enriquecimiento de esferas.	40

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por los conocimientos que me transmitió en los cursos de Maestría, durante el desarrollo del trabajo experimental y por abrirme las puertas hacia el área de mi interés.

A la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez por los conocimientos que me transmitió en el desarrollo de este trabajo, por la paciencia y comprensión.

Al Dr. Alejandro García Carranca por darme un espacio en su laboratorio, a la M. en C. Miriam Cecilia Guido Jiménez por su apoyo técnico y a la M. en C. Roció Méndez Martínez por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A la M en C. Guadalupe Valencia Toxqui por acompañarme en los cursos, por su amistad y apoyo, a la M en C. Yessica Vázquez Cobix por su amistad y apoyo durante los cursos, por aparecer cuando la necesitaba, a David Torres por su apoyo y paciencia, y al M en C. Sergio Israel Rangel Guerrero por explicarme cuando no comprendía y tenderme una mano.

A mi amiga M. en C. Mariel Esperanza Toledo por su sincera amistad y apoyo; a la M. en C. Leny Palma Pérez Díaz por su paciencia al explicarme, su amistad y por su apoyo en los experimentos; al M. en C. Miguel Ángel Saravia Sánchez por compartir siempre conmigo su valioso tiempo y conocimientos, al M. en C. Heriberto Abraham Valencia González por la gran calidad humana que tiene de enseñar y compartir lo que posee, y al M. en C. Ángel Arturo Gómez Gallegos por su tiempo y ayuda, muchas gracias a todos.

Al Dr. Enrique Pérez por asesorarme amablemente con los ensayos de invasión, a la QFB. Damaris Priscila Romero Rodríguez por su tiempo, enseñanzas durante los experimentos de citometría, y al Biol. Pedro Pérez Olmos por su tiempo y por enseñarme inmunohistoquímica y al Dr. Roberto Eduardo Herrera Goepfert por facilitar las muestras de pacientes.

Esta tesis fue financiada por el proyecto de CONACyT 179894.

DEDICATORIA

Lo más valioso que pueda existir en mi persona y todos los pasos que he dado están siempre dedicados a la luz de mi vida José Felipe Rugerio; a la persona más fuerte que he conocido, Angélica Martínez y a los amores de mi vida, Carla Mónica Rugerio y Luis Felipe Rugerio.

1. RESUMEN

Las células troncales cancerosas son una subpoblación de células troncales con capacidad tumorigénica, por su capacidad de autorenovación y proliferación con un potencial específico de diferenciación que da lugar a poblaciones celulares heterogéneas que mantienen un tumor. La activación de la vía de señalización HGF/c-Met se ha relacionado con el crecimiento invasivo, en el que algunas células tumorales migran e invaden otros tejidos por la transición epitelio-mesenchima. Por otra parte, la activación de diversas vías de señalización se ha asociado con la troncalidad de algunas células cancerosas, por ejemplo, la activación del receptor c-Met indujo el fenotipo tipo troncal en cáncer de próstata. Debido a que, la activación de la vía de señalización HGF/c-Met podría ser crucial para la troncalidad, el objetivo de este estudio fue evaluar la activación del receptor c-Met en cultivos enriquecidos de células troncales de cáncer gástrico (CTCG) derivados de las líneas celulares AGS y NCI-N87. Resultados: Se estandarizaron las condiciones para formar esferas y enriquecer la población de CTCG. El análisis por citometría de flujo mostró el aumento del porcentaje de células CD44^{high} (marcador de CTCG) en cultivos enriquecidos de CTCG, así como la activación de c-Met (aumento de la fosforilación del receptor) y el incremento de los factores de transcripción de troncalidad, Oct4 y Nanog en comparación con cultivos en monocapa. La inhibición específica de la fosforilación del receptor c-Met por PHA665752 resultó en la disminución de las proteínas Oct4 y Nanog en cultivos en esfera y en un menor número de colonias formadas a través de ensayos clonogénicos en comparación con el control (cultivo sin PHA665752), en los que se observaron colonias con un "fenotipo colibrí", relacionado a invasividad. En conclusión, la fosforilación de c-Met podría estar involucrada en el mantenimiento de la troncalidad y con la capacidad invasiva de una subpoblación GCSC específica.

2. ABSTRACT

Cancer Stem Cells (CSC) are a limited subpopulation of stem cells with tumorigenic capacity, due to their ability for self-renewal, proliferation with a specific potential of cell differentiation that results in heterogeneous cell populations that rinse a tumor. Activation of the cell signal transduction pathway HGF/c-Met in several carcinomas has been linked to the invasive growth phenomenon, in which some tumor cells migrate and invade other tissues by the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Moreover, activation of various signaling pathways has been associated with the stemness of some cancer cells, for example, the activation of c-Met receptor induces stem-like phenotype in prostate cancer. Since, HGF/c-Met signal pathway activation could be crucial for stemness, the aim of this study was to evaluate the activation of c-Met receptor in Gastric Cancer Stem Cells (GCSC) enriched culture derived from gastric cancer cell lines. Results: We standardized the conditions to form spheres derived from AGS and NCI-N87 gastric cancer cell lines to enrich GCSC population. Flow cytometry analysis showed an increase of the percentage of CD44^{high} cells in gastric spheres used as GCSC marker. We observed an activation of c-Met in GCSC enriched culture due to the increase of phosphorylation of this receptor. Also, we observed up-regulation of the stemness transcription factors, Oct4 and Nanog in gastric spheres compared to monolayer cultures. The specific inhibition of phosphorylation of c-Met receptor by PHA665752, decreased Oct4 and Nanog proteins in gastric sphere cultures. Moreover, through clonogenic assays, we observed that inactivation of c-Met receptor results in a smaller number of colonies compared to cells growing in non-inhibitor cell culture conditions, while colonies without treatment showed “hummingbird phenotype”, that is related to an invasive phenotype. In conclusion, phosphorylation of c-Met receptor might be involved in stemness and also in the invasive capacity of a specific GCSC subpopulation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CÁNCER

En lo general, las células de tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento, la entrada y progresión del ciclo celular garantizando la homeostasis en la proliferación, el mantenimiento de la arquitectura y función normal de los tejidos (Hanahan D. & Winberg R., 2011).

El cáncer es una enfermedad compleja debido a la amplia variedad de mecanismos celulares y moleculares asociados al inicio y progreso de la enfermedad; que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012 causó la muerte de 8.2 millones de personas a nivel mundial.

El cáncer está formado de un complejo heterogéneo de células transformadas (Kreso A. & Dick J., 2014). Debido a que el cáncer es un proceso transformativo, en estadios avanzados las células cancerosas podrían no contener las características moleculares y morfológicas de la célula que les dió origen (White A. & Lowry W., 2015).

Dentro de las alteraciones en la fisiología celular que caracterizan la transformación celular, se encuentran (Figura 1):

- **Sostenimiento de la señalización de proliferación.** Las células cancerosas producen factores de crecimiento (ligandos) que activan a sus receptores, resultando en la estimulación autocrina de la proliferación y el envío de estas señales para estimular a células normales.
- **Evasión a supresores de crecimiento.** Un alto porcentaje de células cancerosas tienen mutaciones en el gen p53 que conlleva a la disminución o eliminación de p53, afectando la apoptosis o muerte celular programada vía p53. De igual forma, Retinoblastoma (Rb) es otro gen que se encuentra frecuentemente mutado, el cual forma un complejo con el factor de transcripción E2F. En conjunto p53 y Rb llevan a cabo la regulación del ciclo celular.

- **Resisten la muerte celular.** Se ha observado una regulación positiva de Bcl2, cuya función es suprimir la actividad de Bax y Bak, que en conjunto permiten la liberación del citocromo C de la mitocondria para activar las caspasas.
- **Establecen la inmortalidad replicativa.** En tumores se ha observado un incremento de la actividad de la teleromerasa, lo que permite mantener la longitud de los telomeros para evitar la senescencia y apoptosis.
- **Inestabilidad genómica y mutación.** Las células cancerosas acumulan mutaciones que les confieren ventajas selectivas de crecimiento (White A. & Lowry W., 2015).
- **Activan la angiogénesis.** En el desarrollo de un tumor se promueve, la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los ya existentes; esta neovasculatura, además de ser distorsionada y de mayor tamaño, presenta excesiva ramificación y flujo sanguíneo errático.
- **Activan la invasión y metástasis.** Caracterizada principalmente por la pérdida de cadherina epitelial (Del inglés, "epithelial cadherin" E-cadherina) (Hanahan D. & Winberg R., 2011).

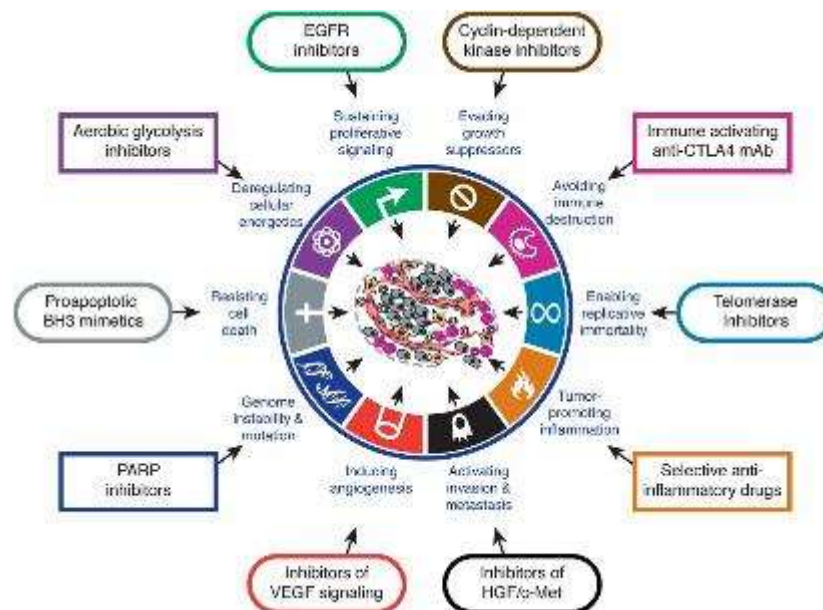


Figura 1. Características principales del Cáncer. Los cambios característicos en células cancerosas (letras en color azul) y las estrategias para contrarrestar sus efectos (recuadros de colores). (Hanahan D. & Winberg R., 2011).

Todas las características de cáncer, incluyendo las mencionadas anteriormente, permiten inferir en sí, la complejidad de una neoplasia maligna. De manera particular, dentro de las neoplasias más frecuentes del tubo digestivo a nivel mundial, se encuentra el cáncer gástrico. Para comprender los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad, resulta útil conocer la estructura y función del estómago.

3.2 EI ESTÓMAGO

El estómago es un órgano parecido a un saco, que tritura el bolo alimenticio a través de los movimientos que realiza para mezclarlo con jugos gástricos segregados por la mucosa gástrica, por ejemplo, el ácido clorhídrico disminuye el pH del estómago para eliminar microorganismos y transformar el pepsinógeno en pepsina para llevar a cabo la digestión de proteínas. Anatómicamente, el estómago se divide en 4 secciones; el cardio, fondo, cuerpo y píloro, este último, a su vez se subdivide en píloro-antro y canal pilórico (Han M. & Oh S., 2013). El epitelio gástrico es un epitelio columnar simple, formado por invaginaciones mucosas con forma tubular conocidas como unidades gástricas, que se dividen en dos partes: la fosa, revestida por células secretoras de moco y la glándula, compuesta de diversos tipos celulares, localizados en tres regiones distintas, el istmo, el cuello y la base (Figura 2).

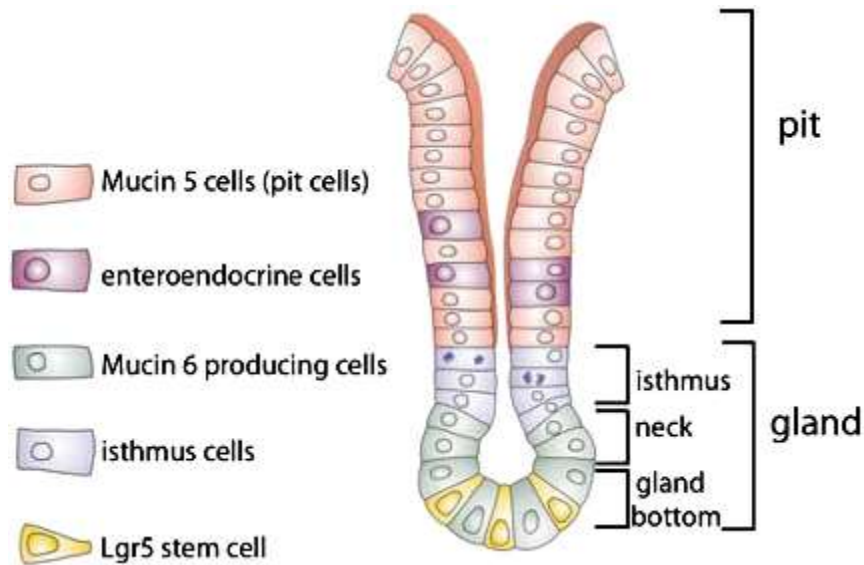


Figura 2. División anatómica y composición celular de las unidades gástricas del antro. Cada unidad gástrica se divide en fosa y glándula, cada una con distintas poblaciones celulares que permiten la digestión, las principales diferencias entre las unidades gástricas del antro y del cardias son las células que las conforman y la longitud de la fosa; más corta para las unidades gástricas del cuerpo (Vries R. *et al.*, 2010).

La composición de las unidades varía respecto a la región anatómica, por ejemplo, en el cuerpo se encuentran células parietales o células secretoras de ácido clorhídrico, células jefe que contienen gránulos zimógenos y secretan la enzima pepsinógeno y finalmente células endocrinas, que producen hormonas como somatostatina, histamina y leptina. Por otra parte, en el antro-píloro se encuentran células secretoras de mucina gástrica protectora, células enteroendocrinas que producen gastrina y somatostatina, y ocasionalmente células parietales.

El cáncer gástrico u otras afecciones puede producir diversos síntomas, por ejemplo, incomodidad estomacal durante la ingesta, sensación de hinchazón después de comer, náuseas, pérdida de apetito y acidez estomacal. Sin embargo, en estadios avanzados del cáncer algunos síntomas generales son: sangre en las heces, vómitos, pérdida de peso sin razón conocida, dolor de estómago, ictericia, ascitis y problemas para tragar.

Para detectar y diagnosticar el cáncer gástrico se utilizan diversas pruebas, entre las que se encuentran:

- **Exámenes físicos** para verificar si existen bultos o cualquier anomalía.
- **Estudios químicos y recuento sanguíneo completo**
- **Endoscopia superior** para verificar si hay zonas anormales.

Los pacientes con CaG presentan una pobre prognosis y la tasa de supervivencia de 5 años es sólo del 20% (Nagini S., 2012).

3.3 CÁNCER GÁSTRICO

El CaG se refiere a cualquier neoplasia maligna que aumenta y se extiende entre la unión gastroesofágica y el píloro (McLean M. & El-Omar E., 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012 murieron 723 000 personas a causa de cáncer gástrico, siendo Asia Oriental y Europa Central y del Este las regiones más afectadas. En el mismo año, GLOBOCAN reportó que el CaG ocupó el 5° lugar en incidencia y el 3° lugar en mortalidad en hombres y mujeres a nivel mundial (Figura 3).

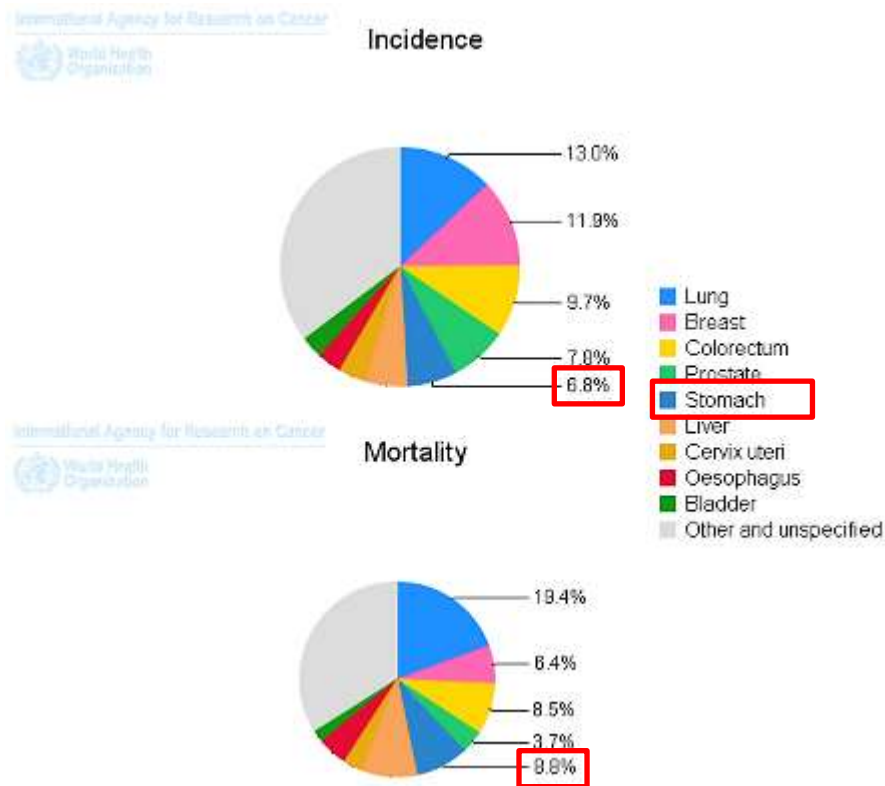
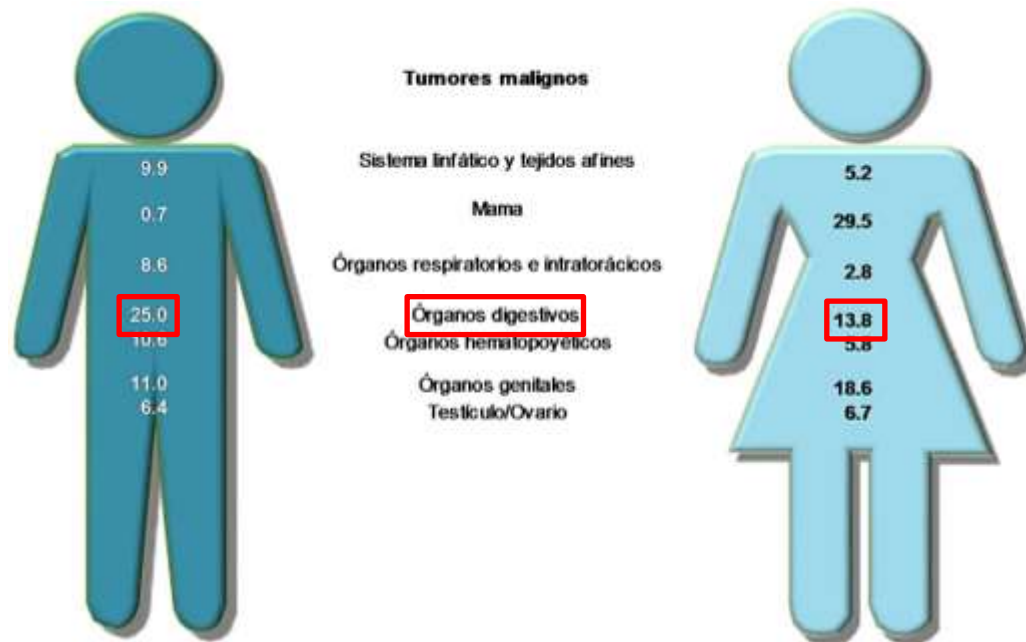


Figura 3. Incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer a nivel mundial. La incidencia de CaG (6.8%) se encuentra por debajo de la incidencia de cáncer de pulmón, de mama y colorrectal, sin embargo, respecto a la mortalidad (8.8%) se encuentra por encima de los anteriores tipos de cáncer. Los datos para CaG se muestran en color azul marino en ambas gráficas. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/stomach-new.asp>.

En México, según el INEGI en 2013 las principales causas de morbilidad hospitalaria (análisis de las altas de hospitales públicos y privados) en la población de 20 años y más; en hombres el cáncer de órganos digestivos fue del 25%, el porcentaje más alto sobre el cáncer de órganos genitales y hematopoyéticos, mientras que en mujeres el cáncer de órganos digestivos fue del 13.8%, de bajo del cáncer de mama y de órganos genitales (Figura 4); cabe destacar que tanto para hombres y mujeres, la morbilidad hospitalaria por cáncer de órganos digestivos aumenta con la edad (Suplementaria 1).



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C15-C26, C30-C39, C50-C58, C60-C61, C63, C81-C86.
Fuente: SSA (2015). Base de Registros Hospitalarios 2013. Proceso INEGI.

Figura 4. Morbilidad hospitalaria por cáncer en México en 2013. En hombres, en hospitales la morbilidad alta se encuentra en los órganos digestivos por encima de la registrada en órganos genitales; mientras que la morbilidad más alta en mujeres corresponde a cáncer de mama, en órganos genitales y en tercer lugar a cáncer en órganos digestivos. Disponible en http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

Durante el 2013 del total de defunciones en la población de 20 años y más, 13.5% se debieron a algún tumor y de estas, 93.7% por tumores malignos. Del total de tumores malignos, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad en mujeres y hombres con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes (Suplementaria 2), según cifras del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).

Dentro de los tipos de cáncer que afecta el aparato digestivo, se encuentra el CaG, que es un tumor sólido que involucra complejas interacciones genéticas (factores adquiridos y heredados), ambientales (consumo de cigarro, dieta, sobrepeso, obesidad, estilo de vida, factores socioeconómicos, así como la infección de *Helicobacter pylori* y del virus Epstein-Barr (EBV), epigenéticas y

entre otras, que contribuyen a la iniciación y progresión de esta neoplasia (McLean M. & El-Omar E., 2014).

Aproximadamente el 95% de los tumores gástricos son de origen epitelial, a los que se denominan adenocarcinomas (Nagini S., 2012). Acorde a la clasificación de Lauren, el CaG se divide en 2 subtipos:

- **El subtipo intestinal.** Se origina generalmente a partir de gastritis, seguido de metaplasia (un proceso reversible en el que un tipo celular adulto de un órgano específico es sustituido por otro tipo celular) y displasia (alteración de las células del adulto caracterizada por la modificación de su tamaño, forma y organización) originado por un antecedente de inflamación crónica usualmente inducido por la infección de *Helicobacter pylori*. Histológicamente, el tipo intestinal se caracteriza por una neoplasia cohesiva que forma estructuras tubulares glandulares, similares a las observadas en el intestino (Han M. & Oh S., 2013).
- **El subtipo difuso.** Se forma de células malignas que infiltran el tejido circundante (Wee A. *et al.*, 1992), y tiene su origen en la mucosa gástrica normal sin un estado premaligno definido. Se asocia a la pérdida de cohesión celular debido a mutaciones (deleción, mutación del marco de lectura, del sitio de splicing o cambio de sentido) en la región central del gen *CDH1* que codifica para la cadherina 1 o E-cadherina y que causa la ausencia o expresión aberrante de la proteína (Paredes J. *et al.*, 2012). Por otra parte, el receptor de tirosina cinasa c-Met es un receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos (del inglés, “hepatocyte growth factor”, HGF) que particularmente en el subtipo difuso se encuentra sobre-expresado (Yashiro M. *et al.*, 2013).

Dentro de las teorías que explican el origen del cáncer, se encuentra el modelo jerárquico, en el que solo una pequeña sub-población presente en el tumor, tiene la capacidad de originar y sostener el crecimiento tumoral. A estas células con alto potencial tumorigénico, se les conoce como células troncales cancerosas (Del inglés, Cancer Stem Cells, CSCs).

3.4 CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales (SC) se encuentran en la punta de la organización jerárquica, seguido de las células progenitoras con un alto potencial proliferativo en donde se encuentran células llamadas de amplificación transitoria, y células diferenciadas terminalmente.

Las SCs se caracterizan por:

- Capacidad de perpetuarse a ellas mismas a través de la autorenovación (Figura 4A).
- Poseer capacidad de diferenciación (Figura 4B).
- Regular el balance relativo entre autorenovación y diferenciación, a lo que se denomina homeostasis (Reya T. *et al.*, 2001).

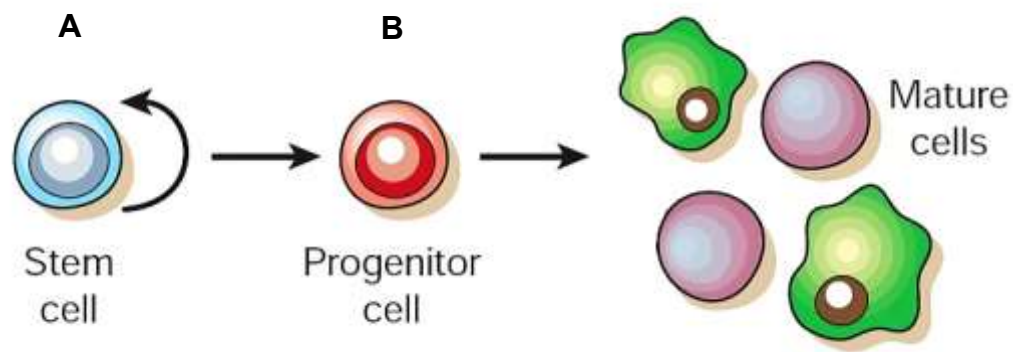


Figura 4. Autorenovación y diferenciación en SC. La capacidad de la autorenovación de una SC permite la división celular conservando el mismo estado indiferenciado, características de troncalidad, así como el mismo potencial de autorenovación, mientras que la capacidad de diferenciación (dependiendo de su potencial de diferenciación), permite la existencia de uno o diferentes tipos celulares especializados; todo esto bajo mecanismos estrictos que permitan mantener la homeostasis (Reya T. *et al.*, 2001).

La **capacidad de autorenovación** se refiere a una división celular en la que una o ambas hijas permanecen indiferenciadas y retienen la habilidad de dar lugar a otra célula troncal con la misma capacidad de proliferación que la célula parental; una SC puede producir dos células hijas idénticas

(autorenovación simétrica) (Figura 3A) con la capacidad de garantizar que esta población sea mantenida o expandida por crecimiento clonal (Kreso A. & Dick J., 2014) persistiendo por el tiempo de vida del organismo (Figura 4A y 4B). La autorenovación es un proceso biológico que involucra estados y modificadores epigenéticos, la activación de vías de señalización, así como a factores de transcripción, por ejemplo, OCT4, Nanog y SOX2.

El **potencial de diferenciación** tiene lugar través de la división celular, ya que pueden resultar dos células hijas con diferentes características, es decir una SC y una célula progenitora (autorenovación asimétrica) o dos células troncales o 2 progenitoras (diferenciación simétrica). Las células progenitoras tienen capacidad de proliferar y progresivamente se convierten en células terminalmente diferenciadas y su capacidad de proliferar disminuye.

Según su potencial de diferenciación, las células troncales se clasifican en totipotentes (dan origen a un individuo, a los tejidos de las 3 capas germinales, endodermo mesodermo y ectodermo; y al tejido extraembrionario), pluripotentes (producen células derivadas de las 3 capas germinales), multipotentes (generan tipos celulares derivados de una sola capa germinal) y unipotentes (dan origen a un solo linaje celular).

En un tejido adulto las SCs están presentes y permiten que el organismo pueda recuperarse de una lesión manteniendo la homeostasis (Vries R. *et al.*, 2010).

Las SCs están reguladas por **homeostasis** para garantizar la sustitución eficiente de las células dañadas y limitar la tasa de proliferación de las SC y células progenitoras, sin descuidar la demanda celular de los tejidos que en cualquier momento pueden ser dañados, por su parte las SC en un adulto restringen su expansión al permanecer quiescentes, mientras que las células progenitoras a pesar de su numerosa expansión, tienen un “tiempo de vida” limitado que les protege de la acumulación de mutaciones (Vries R. *et al.*, 2010).

Los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis requieren la integración de señales locales y sistémicas, que actualmente están comenzando a ser entendidas; sin embargo, se sabe que la desregulación en la tasa de proliferación de las SC y células progenitoras puede conducir al cáncer, dando lugar a CSC (Biteau B. *et al.*, 2011).

3.4.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA AUTORENOVACIÓN Y PLURIPOTENCIA

Las células troncales embrionarias son células pluripotentes de la masa interna del blastocito y en las que los factores de transcripción OCT4, SOX2 y Nanog permiten el mantenimiento de su estado indiferenciado. SOX2 mantiene la expresión de OCT4, mientras que Nanog y OCT4 inhiben la expresión de genes de diferenciación. A medida que avanza el desarrollo embrionario, la expresión de OCT4, SOX2 y Nanog disminuye. En el tejido adulto, se detecta una baja expresión de Nanog en testículos, ovario, hígado, el bazo y riñón; y una expresión débil en el timo, cerebro, intestino, útero y corazón (Zhao X. *et al.*, 2014), mientras que se ha demostrado la expresión de Oct4 en el hígado, riñón y páncreas; tejido epitelial y mesenquimal; glándula mamaria, y en células troncales gástricas (Tai M. *et al.*, 2005).

La autorenovación del epitelio del estómago, comparte diversas características con otros órganos, por ejemplo, la actividad de células troncales. El tracto gastrointestinal adulto contiene poblaciones de células troncales multipotentes que dan lugar a una descendencia aproximada de 70 billones de células epiteliales por día (250 gramos) (Giannakis M. *et al.*, 2005).

3.5 CÉLULAS TRONCALES GÁSTRICAS

El nicho de células troncales se posiciona en la región del istmo de la glándula gástrica en el que se ha observado proliferación celular y células inmaduras, pero los marcadores de células troncales gástricas aún no han sido definidos,

sin embargo, se sugiere que todas las células epiteliales de cada una de las estructuras anatómicas se derivan de un único ancestro común.

Diversos estudios sugieren la participación de diversas vías de señalización relacionadas con la autorenovación y la diferenciación en células troncales gástricas (Figura 5), por ejemplo:

- La sobre-expresión de la vía Wnt en células epiteliales gástricas resulta en pérdida de la diferenciación celular y en la formación de adenomas.
- La señalización de la vía Notch ha sido implicada en la homeostasis y en el desarrollo epitelial del estómago; mientras que en el adulto presenta actividad en el istmo de la glándula gástrica, caracterizada por ser una zona de proliferación celular. La activación de la vía de Notch en un linaje de células parietales las convierte a células progenitoras que producen todos los linajes celulares epiteliales del estómago (Kim T. & Shivdasani R., 2011).
- El receptor de la vía de señalización Hedgehog, Patched 1 (Ptch 1) está expresado en células epiteliales gástricas; se ha sugerido que su activación induce la diferenciación de células troncales gástricas en el estómago adulto por la inducción de E-cadherina.

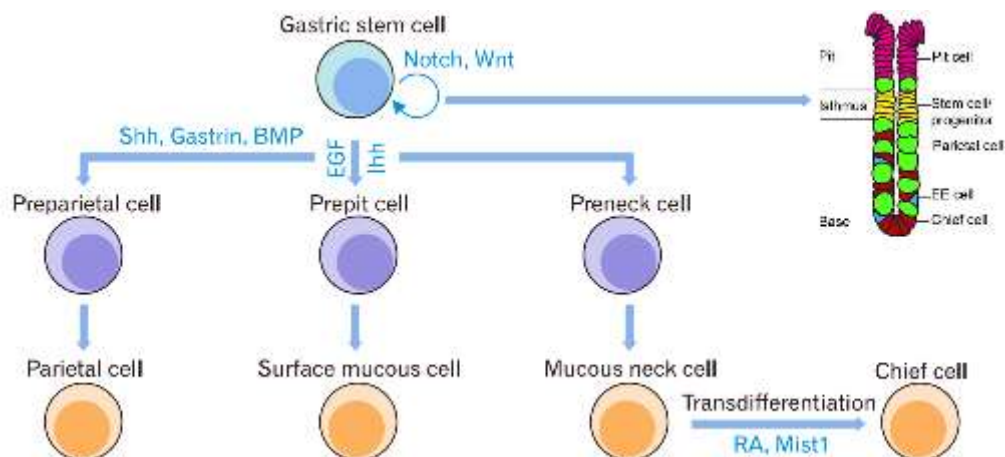


Figura 5. Generación secuencial de células epiteliales gástricas a partir de células troncales gástricas. Las células troncales gástricas se encuentran en el istmo de la glándula gástrica, para su mantenimiento intervienen las vías de

señalización Notch y Wnt, mientras que la vía de señalización Hedgehog induce la diferenciación. (Kim T. & Shivdasani R., 2011).

Al parecer, las vías de señalización que normalmente están implicadas en la autorenovación al perder su regulación dan lugar a las CSC.

3.6 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

La Asociación Americana para la Investigación del Cáncer (Del inglés, The American Association for Cancer Research, AACR) define a las CSCs como una subpoblación de células dentro de un tumor que poseen la capacidad de autorenovación y generación de linajes heterogéneos de células cancerosas que constituyen un tumor (Brungs D. *et al.*, 2015).

La primera evidencia de la población de CSC fue resultado de la investigación de Bonnet y Dick, quienes demostraron que la población celular CD34+ CD38- poseía la capacidad de autorenovación y de reconstituir el espectro completo de poblaciones celulares observadas en la leucemia mieloide aguda, así como de reproducir la enfermedad de forma serial en ratones inmunodeficientes.

Existen diversos modelos que explican la formación del cáncer, entre los que se encuentran:

- **El modelo estocástico** explica que una o varias células adquieren mutaciones y que por división no controlada acumulan más mutaciones que dan lugar a un tumor y que cualquier célula que lo integra tiene igual capacidad de propagar el cáncer (Vries R. *et al.*, 2010).
- **El modelo jerárquico o hipótesis de CSC** sostiene que las células de un tumor presentan una organización jerárquica y que en una limitada subpoblación de células troncales con alta capacidad tumorigénica, se encuentran las CSC y células iniciadoras de tumor, que debido a su capacidad de autorenovación, proliferación y potencial de diferenciación que da lugar a un linaje heterogéneo de células tumorales diferenciadas; estas células son

responsables de la generación, crecimiento, desarrollo sostenido, resistencia y recurrencia del tejido tumoral, mientras que las células cancerosas que carecen de propiedades de troncalidad, no serán capaces de iniciar tumores (Figura 6) (Li K. *et al*, 2014, Gentry S. & Jackson T., 2013). Este modelo se ha observado principalmente en leucemia mieloide y cáncer de mama (Magge J. *et al.*, 2012).

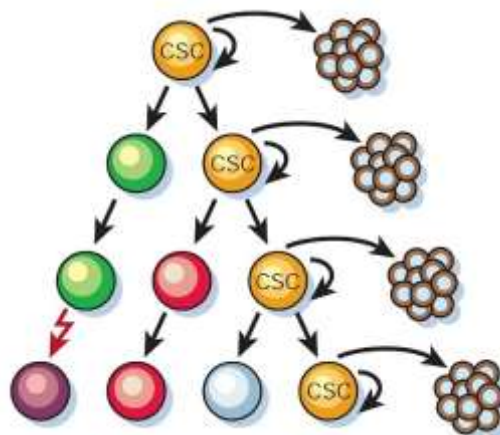


Figura 6. Hipótesis de CSCs. La heterogeneidad de un tumor está determinada por células sujetas a una jerarquía, en la que solo las CSCs puede dar lugar a un nuevo tumor y son responsables del crecimiento y desarrollo sostenido de los tumores; poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a un linaje de células cancerosas, pero éstas no poseen características de troncalidad (Reya T. *et al.*, 2001).

- **El modelo dinámico** basado en el modelo jerárquico, propone que la población de CSC está regulada por el ambiente celular tumoral y que el fenotipo CSC puede ser inducido en células cancerosas diferenciadas por la exposición a factores de crecimiento secretados por células estromales, sugiriendo así, una vía bidireccional entre las poblaciones celulares de CSC y células diferenciadas (Brungs D. *et al.*, 2015).

Dentro de los diversos tumores sólidos se han encontrado múltiples subpoblaciones celulares que incluye a CSC (Kreso A. & Dick J., 2014). Así, las células troncales cancerosas se definen como células que dentro de tumor poseen la capacidad de:

- Autorenovación
- Diferenciación a linajes heterogéneos de células cancerosas que comprenden el tumor.
- Capacidad, no sólo de originar una lesión cancerosa, sino que además mantienen el crecimiento tumoral.

Se ha considerado que la diferencia entre las SC de un tejido normal y de un tejido canceroso es la pérdida de la homeostasis promoviendo el descontrol de la proliferación celular (Gentry S. & Jackson T., 2013).

Existe un creciente interés por identificar, separar y estudiar las CSC y para tal fin se han empleado diversas técnicas como la identificación de poblaciones colaterales (Del inglés, Side Population, SP) que a través de los transportadores ABC llevan al exterior el colorante Hoechst; la evaluación de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (Del inglés, aldehyde dehydrogenase, ALDH) y la identificación y aislamiento de CSC que expresan combinaciones únicas de marcadores de superficie. Sin embargo, los métodos experimentales empleados para confirmar una población de CSC son:

- **Ensayos de esferoides tumorales**, es un método relativamente rápido que puede tardar varios meses y que ha demostrado aumentar la proporción de CSC. Las esferas están conformadas por CSC y células progenitoras que son capaces de formar esferas. Otra limitación de este ensayo es que no todas las CSC forman esferoides.
- **Pasajes seriales de tumores en modelos animales**, es considerado el estándar de oro fisiológicamente relevante que demuestra la autorenovación y la capacidad tumorigénica de las CSC (Brungs D. *et al.*, 2015). Lo anterior, debido a que las células diferenciadas no generan tumor; las células progenitoras generan tumor, pero no de forma serial; mientras que, las células troncales generan tumores de forma serial (Cermeño E. & García A., 2016).

Recientemente, se han identificado y caracterizado poblaciones colaterales dentro de tumores y líneas celulares de CaG (Fukuda K. *et al*, 2009). En 2009, Takaishi S. y colaboradores identificaron GSCS (Del inglés, Gastric Cancer Stem Cells, GCSC) empleando el marcador de superficie CD44+ en 3 líneas celulares (MKN-45, MKN-74 y NCI-N87) de CaG. La amplia sumatoria de marcadores fenotípicos han permitido identificar GCSC y entre estos marcadores se incluyen Lgr5+, Tr3+, EpCAM+, CD133+, CD26+, CD90+, CD117+, Musashi-16-15 (Revisado en Chen T. *et al*, 2012) evaluados independientemente (Tabla 1). Las GCSC son la base para la aparición del cáncer gástrico y se podrían derivar de células troncales gástricas en los tejidos gástricos o de células troncales mesénquimales de la medula ósea (Li K. *et al.*, 2014).

MARCADOR	DESCRIPCIÓN
ALDH1	Es una enzima intracelular que participa en detoxificación, diferenciación y resistencia a drogas por la oxidación de aldehídos (Wakamatsu Y. <i>et al</i> , 2012). Se ha demostrado que la actividad de ALDH depende de la vía de señalización Notch (Nishikawa S. <i>et al.</i> , 2013).
CD24^{high}	Familia de proteína de superficie celular de 27 aminoácidos, ampliamente glucosilada. Su expresión se correlaciona a estados avanzados, invasividad y metástasis a nodos linfáticos en CaG (Fujikuni N. <i>et al</i> , 2014).
CD44^{high}	Receptor para ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular. CD44 es una glicoproteína transmembranal que pertenece a la familia de las moléculas de adhesión celular, y se involucra en la movilidad, degradación de la matriz; progresión, invasión y

	metástasis en diversos tipos de cáncer (Elliot V. <i>et al.</i> , 2014, Chen S. <i>et al.</i> , 2013).
CD54^{high}	Llamada ICAM-1 (Del inglés, intercelular adhesión molecule-1), es una glicoproteína transmembranal de tipo 1, con 5 dominios extracelulares similares a inmunoglobulinas. Se encuentra en células endoteliales vasculares, fibroblastos, células dendríticas, leucocitos, monocitos y células hematopoyéticas. El decremento en su expresión se asocia a la invasión a nódulos linfáticos en pacientes con cáncer gástrico (Yashiro M. <i>et al.</i> , 2005).
CD133^{high}	Glicoproteína transmembranal de superficie celular que se encuentra en el dominio rico en colesterol de lípidos y ha sido empleado para identificar subpoblaciones de células en tumores sólidos de cerebro y colon (Wakamatsu Y. <i>et al.</i> , 2012).

Tabla 1. Marcadores fenotípicos de troncalidad de GCSC en CaG. ALDH se localiza en el citoplasma de células parietales normales. CD44 se expresa de manera normal en células glandulares del antro y rara vez en el cuerpo del estómago, mientras células CD24^{high} y CD54^{high} en conjunto con CD44^{high} han sido aisladas de tejidos tumorales gástricos de pacientes, ambas combinaciones forman esferas y presentan alta tumorigenicidad. Mientras que, CD133 se expresa de forma normal en la base de las glándulas gástricas y en el antro (Singh S. 2013).

Entre los factores que se han relacionado a la resistencia a drogas citotóxicas empleadas en radioterapia y quimioterapia, se encuentra la capacidad de las CSC de permanecer quiescentes, la actividad de la enzima ALDH, los transportadores ABCG2, entre otros. La resistencia es el mayor obstáculo en el tratamiento contra el CaG, debido al número limitado de terapias que en estos casos se encuentran disponibles actualmente. Se ha demostrado que GCSC forman parte de los mecanismos de resistencia en CaG y entre los

marcadores de troncalidad asociados a la resistencia, se encuentran (Tabla 2):

MARCADOR	RESISTENCIA
ALDH	5-fluorouracil y cisplatino
CD44^{high}	5-fluorouracil, etoposido o VP-16 y radioterapia (Mao J. <i>et al</i> , 2014);
CD133^{high}	Alta resistencia y elevada tasa de recaída (Li K. <i>et al</i> , 2014).

Tabla 2. Marcadores de superficie asociados a resistencia en CaG. Se sugiere que las GCSC son la mayor causa de resistencia a fármacos en cáncer gástrico.

Debido a que algunas CSC son capaces de proliferar y colonizar otras partes del cuerpo, ya que sobreviven en diferentes ambientes y a intensivas terapias anticáncer, esto explica la metástasis y las recurrencias tras largos periodos libres de la enfermedad.

3.7 INVASIÓN Y METÁSTASIS

Como cualquier tejido normal, un tumor requiere de sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la evacuación de los desechos metabólicos y el dióxido de carbono, para lo que se extiende una neovasculatura generada por angiogénesis, concepto que hace referencia a la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes, a través del “encendido angiogénico” que permite que a partir de las células quiescentes de la vasculatura normal, se generen nuevos vasos sanguíneos que ayudan a mantener el crecimiento de las neoplasias. El gen VEGF-A (Del inglés, factor de crecimiento endotelial vascular A, VEGF-A) es sobrerregulado en cáncer por hipoxia y la señalización de oncogenes; y codifica para los receptores VEGF-1-3 que se involucran en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos

durante el desarrollo embrionario y postnatal. En cáncer, los VEGF pueden ser secuestrados en la matriz extracelular y son liberados y activados por las proteasas que degradan la matriz extracelular (Del inglés, extracellular matrix-degrading protease, MMP), por ejemplo, MMP-9, para unirse con su receptor, VEGFR (Hanahan D. & Weinberg R., 2012).

La invasión de tejidos ocurre a través de los vasos sanguíneos generados durante la angiogénesis; y a través de los cuales las células cancerosas entran a los vasos sanguíneos y linfáticos; este proceso se conoce como intravasación, e implica la ruptura de uniones endoteliales de la célula neoplásica con células vecinas para separarse del tumor primario y a través de la transición epitelio mesénquima (Del inglés, epithelial mesenchyma transition, EMT) la célula neoplásica cruza la membrana basal o parénquima de origen para migrar a través de la matriz extracelular (Reymond N. *et al*, 2013).

Posteriormente, la extravasación ocurre y se define como el escape de las células cancerosas del lumen de los vasos sanguíneos y linfáticos hacia el parénquima de tejidos distantes (Hanahan D. & Weinberg R., 2011). La extravasación involucra a quimiocinas y a sus receptores; este proceso ocurre típicamente en pequeños capilares e implica la disrupción de las uniones endoteliales para que las células cancerosas se implanten en tejidos distantes. Las células cancerosas proliferan formando pequeños nódulos de células cancerosas, a lo que se denomina micrometástasis. El tumor sobrevive y prolifera en el nuevo ambiente para formar un tumor clínicamente detectable, a lo que se denomina macrometástasis, y es el último paso de la metástasis, al que se conoce como colonización (Figura 5) (Pennacchiotti S. *et al*, 2003, Yilmaz M. & Christofori G., 2009, Hanahan D. & Weinberg R., 2011, Wang X. *et al*, 2012, Elliot V. *et al*, 2014).

La metástasis es la propagación de células cancerosas de un tumor primario, para formar un tumor secundario en sitios distantes (Schroeder A. *et al.*, 2012)

(Figura 7); es un paso fatal en la progresión de tumores sólidos, que en CaG involucra a órganos como el hígado, los pulmones y huesos.

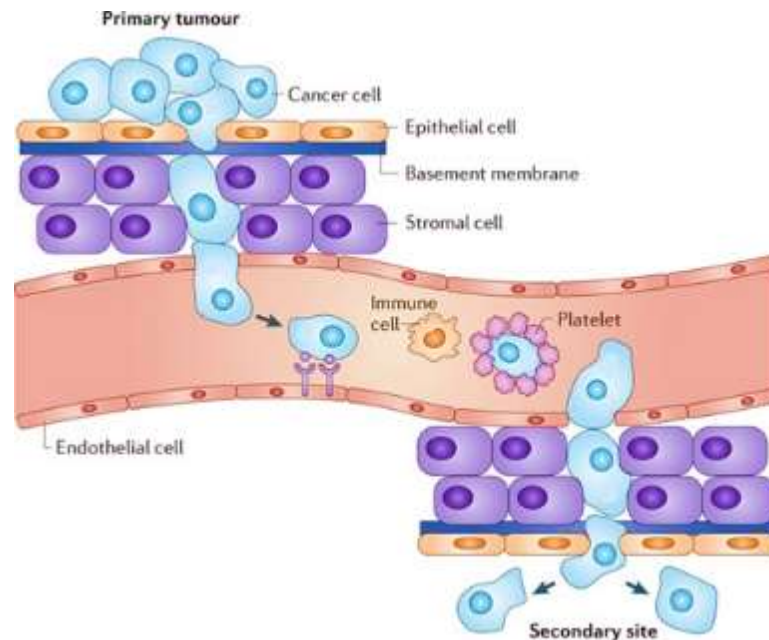


Figura 7. Procesos de metástasis. Involucra la individualización de la CSC, por ejemplo, a través de la EMT para migrar e invadir un tejido distante para formar un tumor secundario (Schroeder A. *et al.*, 2012)

Se ha observado que la transición epitelio-mesénquima es regulada por diferentes vías de señalización. En carcinomas, la activación de la vía HGF/c-MET se ha relacionado con el crecimiento invasivo a través de la activación de la EMT.

Por otra parte, la activación de diversas vías de señalización se ha asociado a la troncalidad que presentan las células cancerosas. En cáncer de próstata la activación de la vía HGF/c-Met y del receptor c-Met indujo el fenotipo “stem-like” (Leenders G. *et al.*, 2011).

3.8 EL RECEPTOR c-Met

Es un receptor de superficie codificado por el proto-oncogene *C-MET*, que se expresa en células epiteliales de diversos órganos durante la embriogénesis y en el individuo adulto en hígado, páncreas, próstata, riñón, músculo y médula ósea. La región extracelular se compone del dominio SEMA, del dominio rico en cisteínas y de 4 dominios “like” inmunoglobulinas, mientras que la región intracelular contiene el dominio cinasa (Figura 8) (Lai A. *et al.*, 2009).

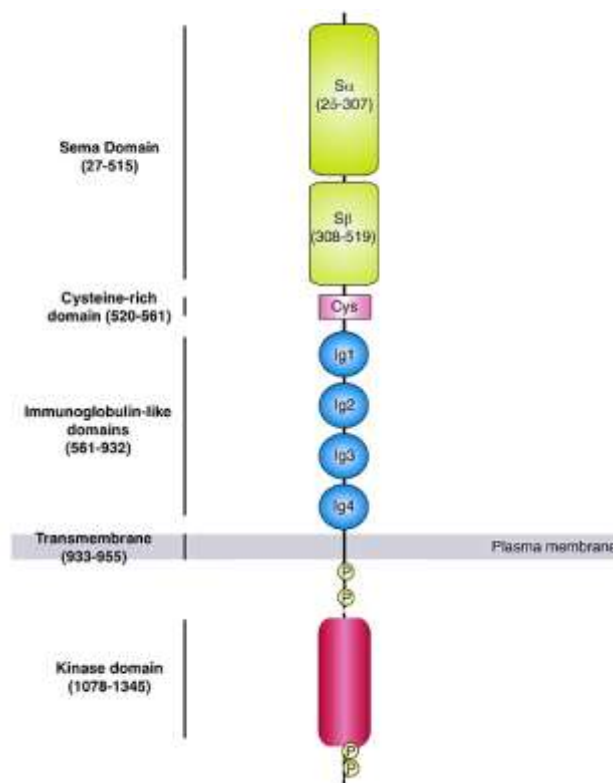


Figura 8. Estructura del receptor c-Met. La región extracelular se caracteriza por un dominio Sema, un dominio rico en cisteínas y 4 dominios tipo inmunoglobulina. La dimerización del receptor causa la transfosforilación de los residuos de tirosina del dominio cinasa en el tallo terminal del Met, que a través de la unión de proteínas adaptadoras puede coordinar vías de señalización que modulan al citoesqueleto de actina, la adhesión celular y migración.

El ligando del receptor c-Met es el factor de crecimiento de hepatocitos (Del inglés, hepatocyte growth factor, HGF) o factor de invasión (Del inglés, scatter

factor, SF), una citocina pleiotropica secretada por células mesenquimales, que promueve la proliferación celular, sobrevivencia, movilidad, diferenciación y morfogénesis (Organ S. & Tsao M., 2011). Los efectos autocrinos y/o paracrinos de HGF han sido demostrados en varios tumores humanos.

3.9 LA VIA DE SEÑALIZACION HGF/c-Met

c-MET es una glicoproteína que consiste de dos subunidades, α (50kDa) y β (145kDa) unidas por un puente disulfuro, que al reconocer a su ligando se heterodimerizan y al interior de la célula se transfosforilan 2 residuos de tirosina 1234 y 1235 del dominio catalítico tirosina cinasa (del inglés, tirosine kinase, TKIs) y posteriormente, las tirosinas 1349 y 1356, que sirven como sitios de acoplamiento para proteínas intracelulares adaptadoras que permiten la cascada de señalización (Marano L. *et al* 2015). Las tirosinas fosforiladas reclutan efectores de señalización que incluyen las proteínas adaptadoras GRB2 (Del inglés, growth factor receptor bound protein 2), SHC (Del inglés, Src homology-2-containing) y GAB1 (Del inglés, associated binding protein 1), una proteína multiadaptadora que una vez fosforilada por c-MET crea sitios de unión para proteínas efectoras corriente abajo; GAB1 puede unirse directamente a c-MET o a través de GRB2 (Figura 9) (Organ S, & Tsao M., 2011).

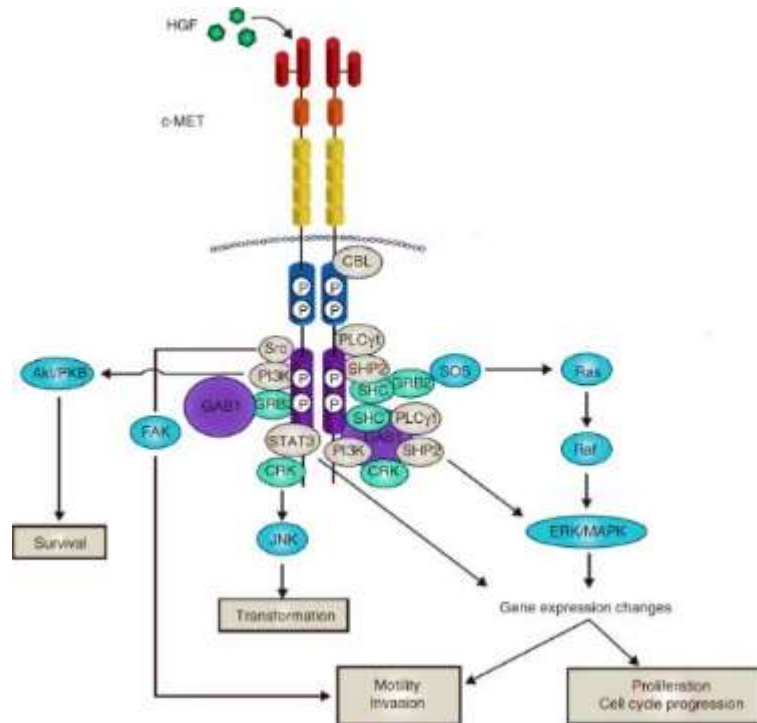


Figura 9. La vía de señalización c-Met. El receptor c-Met al unirse con HGF se homodimeriza y se fosforilan 2 residuos de tirosina 1234 y 1235; y posteriormente, las tirosinas 1349 y 1356 que reclutan las proteínas adaptadoras GRB2, SHC, GAB1 y SOS que activan a RAS permitiendo la activación indirecta de la cinasas RAF, que activan a MEK y finalmente a MAPK. La vía de señalización Ras-MAPK juega un rol esencial en la EMT (Organ S. & Tsao M., 2011).

Dentro de la cascada de señalización de c-Met se encuentra parte de la vía de señalización Ras-MAPK (Del inglés, rat sarcoma viral, RAS; mitogen activated protein kinase, MAPK) a la que se ha atribuido un rol esencial en la EMT, que resulta en la pérdida de adhesión intracelular y cambio en la forma celular (Eder J. *et al.*, 2009). La activación de RAS depende de SHC, GRB2 y de la unión del intercambiador del nucleótido guanina SOS (Del inglés, Son of Sevenless, SOS); permitiendo la activación indirecta de la cinasas RAF (Del inglés, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, RAF) que subsecuentemente activan a MEK (MAPK effector kinase, MEK) y finalmente a MAPK. Esta cinasa se transloca al núcleo y activa factores de transcripción (Figura 8) (Organ S. & Tsao M., 2011), entre los que se encuentran SNAIL, SLUG, δ EF-1 y SIP1, que inducen la EMT por la represión de E-cadherina,

necesaria para el mantenimiento de la adhesión celular (Horiguchi K. *et al*, 2009), promoviendo la motilidad celular y el comportamiento invasivo (Lamouille S. *et al*, 2014). Por otra parte, estudios en las líneas celulares de cáncer de seno MCF-7 y MDA-MB-231 sugieren que ERK1/2 modula la expresión de las MMP2 y MMP9, necesaria para la migración e invasión celular (Moulik S. *et al.*, 2014).

La fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Del inglés, signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) es necesaria para su homodimerización y translocación al núcleo celular donde regula la expresión de diversos genes que permiten la motilidad celular; SNAIL, SLUG Y TWIST, y otros implicados en la transformación celular, proliferación y sobrevivencia, que en conjunto dan lugar a la progresión de los carcinomas (Wendt M. *et al.*, 2014). STAT3 activa la transcripción de genes que promueven la migración celular e invasión de tumores; en células de melanoma regula la transcripción de la metaloproteinasa de matriz 2 (Del inglés, matrix metalloproteinase 2, MMP-2); en células cancerosas sanguíneas induce la expresión de MMP1 y MMP10; y en células epiteliales transformadas, la inducción de MMP-9 (Huang S., 2007). La activación de STAT3 está relacionada a la activación del receptor c-Met, y se ha demostrado que la inhibición de la actividad de STAT3 induce apoptosis en células cancerosas gástricas que presentan este receptor activo (Okamoto W. *et al.*, 2011).

La activación de la vía HGF/c-Met en carcinomas se ha relacionado con el crecimiento invasivo mediante el cual las células tumorales ejercen presión sobre débiles tejidos, migran e invaden, incrementando la metástasis (Pennacchietti S. *et al*, 2003). Por otra parte, el receptor c-Met juega un rol en la angiogénesis tumoral, como un factor independiente y uno de los que puede interactuar con la proliferación angiogénica promovida a través de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (Del inglés, vascular endothelial growth factor, VEGF) y otras proteínas angiogénicas; la vía de señalización

HGF/c-Met incrementa los niveles de VEGF en el tumor y de su receptor en células endoteliales VEGFR2 (Del inglés, VEGFR receptor, VEGFR) (Eder J., *et al*, 2009).

Por lo tanto, el factor de crecimiento HGF induce la EMT (Yilmaz M. & Christofori G., 2009) a través de la activación de la vía HGF/c-Met; en CaG. c-MET constituye además un blanco contra la quimioresistencia que presentan las GCSCs, siendo los inhibidores de c-Met un tratamiento prometedor en estadios avanzados (Yashiro M. *et al*, 2013).

3.10 TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

El epitelio es una barrera permeable que delimita tejidos y órganos; se forma de una o múltiples capas de tejido con diversas funciones. Las células epiteliales muestran polaridad apical-basal, se adhieren y comunican con otras células por uniones intercelulares posicionadas hacia la base de la membrana y estas le permiten definir su fisiología (Lamouille S. *et al*, 2014). Las uniones epiteliales célula-célula y conexiones célula-matriz, son esenciales para la integridad epitelial y se encuentran hacia las superficies basales y apicales, siendo las uniones adherentes (cadherinas) las que regulan la adhesión intercelular, estrechas (occludina y claudina), desmosomas (desmoplaquina) y gap (Yilmaz M. & Christofori G., 2009).

El tejido mesenquimal es de origen embrionario, de la capa del mesodermo; es un tejido de apariencia laxa y gelatinosa en el que están embebidas células no especializadas a partir de las que se desarrollan células de linaje mesodermal y dan lugar a tejido conectivo, grasa, hueso y cartílago (Uccelli A. *et al*, 2008, De Wever O. *et al*, 2008). Las células que presentan un fenotipo mesenquimal se caracterizan por la producción elevada de componentes de la matriz extracelular, capacidad migratoria aumentada, invasividad y elevada resistencia a apoptosis.

La EMT es un tipo de plasticidad que ocurre cuando las células epiteliales se convierten a células tipo mesenquimales, involucrando la activación de factores de transcripción; cambios de forma y fenotipo, tales como la pérdida de adhesión celular y polaridad celular, que permite la adquisición de propiedades migratorias e invasoras, para lo que es necesaria la reorganización de los componentes del citoesqueleto, de una organización circunferencial a una red difusa; y el remodelamiento de la matriz extracelular (De Wever O. *et al*, 2008, Peng Z. *et al*, 2014) (Figura 10) (Lamouille S. *et al*, 2014).

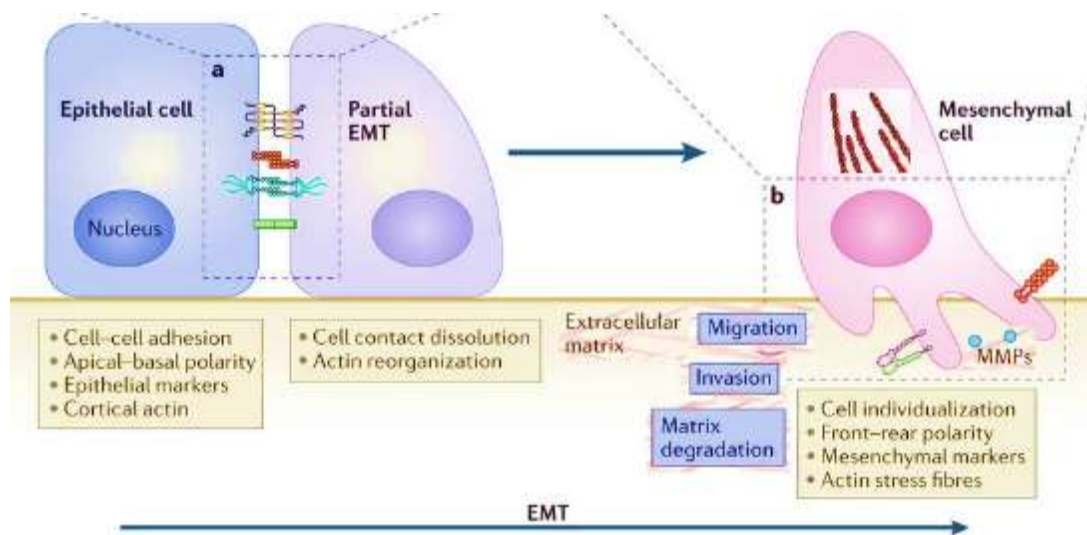


Figura 10. Transición EMT. La conversión del fenotipo epitelial a mesenquimal involucra la pérdida de adhesión y polaridad celular, así como un cambio en el citoesqueleto para que la célula pueda individualizarse, migrar e invadir (Schroeder A. *et al.*, 2012).

La EMT regula la diferenciación de las células troncales embrionarias a través de la expresión y represión de genes epiteliales y mesenquimales para permitir la transición de fenotipos (Lamouille S. *et al*, 2014). La movilidad y la invasión que adquieren las células, se debe a la EMT, caracterizada por pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales reportado en CaG (Murai T. *et al*, 2014).

3.11 MARCADORES DE EMT

Debido a la modificación de los programas de señalización que definen la forma celular y la reprogramación en la expresión genética durante la EMT, existen una variedad de moléculas que pueden ser empleados como biomarcadores (Figura 11).

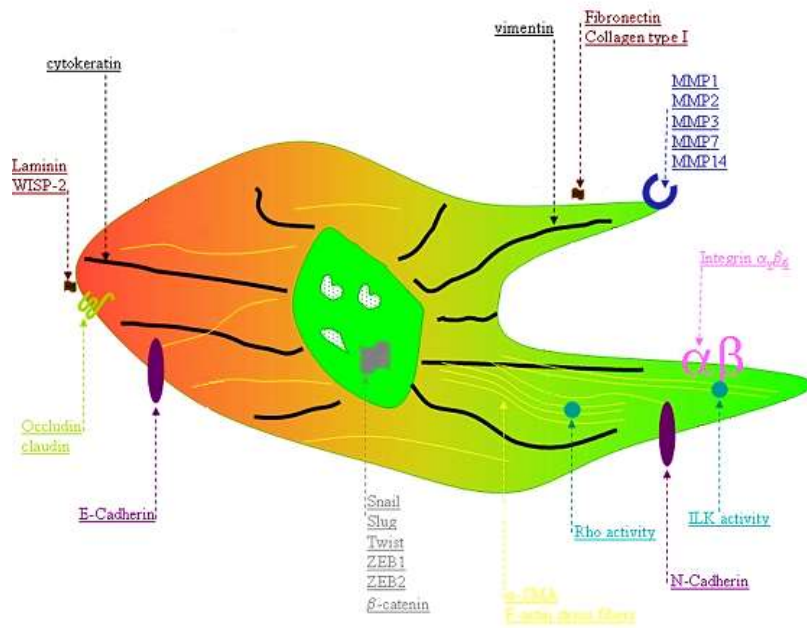


Figura 11. Marcadores de EMT. Hacia la izquierda (color rojo) se observan los marcadores de las células epiteliales y hacia la derecha (color verde) los implicados en la transición a células tipo mesenquimal (De Weber O. *et al.*, 2008).

La pérdida o disminución de E-cadherina se considera un marcador de EMT. E-cadherina es una glicoproteína expresada en células epiteliales y codificada por el gen *CDH1*, que estabiliza las uniones adherentes debido a que está involucrada en el mantenimiento de la adherencia celular e integridad estructural de las hojas epiteliales (Pheng Z. *et al.*, 2014). Esta proteína presenta 3 dominios, al dominio citoplasmático se asocian las cateninas α , β , γ y p120; el dominio transmembranaral conecta el dominio citoplasmático y el

dominio extracelular, este último es dependiente de Ca^{2+} . Los cambios morfológicos observados debido a la supresión de E-cadherina, se deben a que diversos factores de transcripción de la familia ZEB (Del inglés, zinc-finger E-box-binding) como SNAIL, SLUG (SNAIL2), TWIST, E12 (E47, TCFE2A), SIP1 (ZEB2), δ EF1 (ZEB1) se unen al elemento regulador dentro del gen, conocido como E-boxes o E-pal box (Wheelock M. *et al*, 2008, Murai T. *et al*, 2014). Particularmente, la actividad de SNAIL permite que las células adopten un fenotipo de fibroblasto y adquieran propiedades tumorogénicas e invasivas (Cano A. *et al*, 2000). En CaG se reportó que SIP1 y SLUG podrían actuar sinérgicamente en carcinomas intestinales, mientras que SLUG y SNAIL y SIP1 y E12/E47 complementan su efecto en carcinomas difusos (Alves C. *et al*, 2007). La hipermetilación del promotor de E-cadherina en las islas CpG se asocia a casos de CaG familiar (Paredes J. *et al*, 2012) y a la infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis temprana y crónica, y en lesiones precancerosas, indicando que E-cadherina juega un rol importante en el inicio de CaG (Liu X. & Chu M., 2014). Además, la infección por *H. pylori* estimula la digestión proteica del dominio extracelular por MMPs y ADAMs, que genera un fragmento de 80 KDa que se libera a la circulación y al que se denomina E-cadherina soluble y que mediante la detección por ELISA permite conocer el estatus de CaG. La inactivación de E-cadherina puede ser causa de mutación dando lugar a proteínas truncadas, con alteraciones anormales de los sitios de unión a Ca^{2+} , con alta degradación proteolítica, así como pérdida de heterogocidad (Chan A., 2006).

Las células mesenquimales son móviles, polarizadas típicamente expresan la cadherina neural (Del inglés, neural cadherin, N-cadherina). El “encendido de cadherina” se refiere a la transición de la expresión de E-cadherina a N-cadherina; y a que otras cadherinas reemplacen o se coexpresen con E-cadherina (Wheelock M. *et al*, 2007). La ganancia o expresión de N-cadherina en células tumorales permite que estas adquieran la habilidad de invasión linfo-vascular por la pérdida de la cohesión célula-célula en varios tipos de

cáncer, lo que se correlaciona altamente con el proceso de la ganancia de la habilidad metastásica en células cancerosas (Kamikihara T. *et al*, 2012), debido a su interacción funcional con el receptor de superficie celular FGF (Del inglés, fibroblast growth factor receptor, FGFRs) que permite la activación de la vía MAPK-ERK, la que resulta en el incremento de la transcripción de la enzima que degrada la matriz extracelular MMP-9, aumentando así la invasividad celular (Hazan R. *et al*, 2004). En CaG, la expresión de N-cadherina se ha asociado al fenotipo invasivo (Peng Z. *et al*, 2014); además, se ha reportado que el factor de transcripción TWIST es esencial en la EMT durante la metástasis y la invasión celular en la línea celular MKN45 por la sobre-regulación de N-cadherina y fibronectina, y la baja-regulación de E-cadherina (Yang Z. *et al*, 2007); mientras que la tasa de supervivencia de 5 años fue limitada en pacientes con expresión de N-cadherina, en comparación a pacientes con N-cadherina negativa (Kamikihara T. *et al*, 2011).

Durante la EMT, la expresión de un grupo de estructuras esqueléticas o filamentos intermedios cambia con la represión de citoqueratinas y la activación de la expresión de vimentina (VIM); ambas regulan el tráfico de organelos y proteínas asociadas a membrana que permiten la movilidad celular (Lamouille S. *et al*, 2014). VIM es conocida como la proteína 1 específica de fibroblastos (Del inglés, fibroblast-specific protein 1, FSP1), es un marcador mesenquimal que se expresa en varias células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, de linajes hematopoyéticos y gliales (Zeisberg M. & Neilson E., 2009). La expresión de VIM en células epiteliales ha sido asociada con metástasis y supervivencia limitada. En CaG, la expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de VIM se asoció con recurrencia, metástasis distante y pobre supervivencia en pacientes (Otsuki S. *et al*, 2010). Por otra parte, la sobre-expresión aberrante de VIM se asocia a agresividad en varios tumores, así como un fenotipo maligno de CaG; la prognosis de pacientes con VIM fue significativamente peor que en pacientes con VIM negativo, por lo que su expresión podría contribuir al fenotipo

altamente invasivo y puede usarse como un biomarcador para determinar la agresividad biológica de CaG (Fuyuhiko Y. *et al*, 2010).

Las MMP son una familia de enzimas que degradan proteolíticamente varios componentes de la matriz extracelular que se relacionan con una alta invasividad del tumor y potencial metastásico ya que las células tumorales pueden sintetizar grandes cantidades de MMP2 y MMP9. Además, participan en el “encendido angiogénico”. En CaG, las MMP2 y MMP9 se relacionan con el crecimiento, angiogénesis y progresión del carcinoma (Zheng H. *et al.*, 2006).

4. ANTECEDENTES

Takaishi S. y colaboradores en 2009 determinaron a través de FACS que la expresión de CD44 y CD24 en la línea celular NCI-N87 es del 5% (Figura 12). El análisis en otras líneas celulares les permitió concluir que las células de CaG, CD44+ muestran propiedades de células troncales, como autorenovación y dan lugar a una progenie diferenciada.

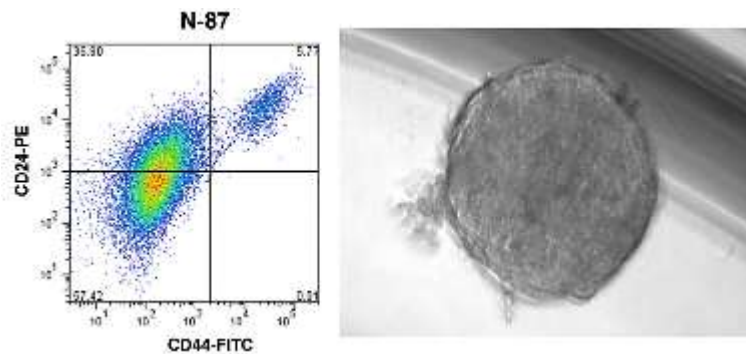


Figura 12. Esferas CD44+ de la línea celular NCI-N87. (A) El porcentaje de esferas CD44+ CD24+ es del 5.77 en la línea celular AGS. (B) Formación de una esfera de la línea celular NCI-M87.

Yang L. y colaboradores en 2011, estudiaron el potencial tumorigénico de las GCSC de la línea celular de CaG SGC7901 y determinaron que las células derivadas de esferas tumorales (SGC7901-SC) exhibieron mayor potencial tumorigénico y capacidad multipotente de diferenciación *in vivo* en comparación a células en monocapa (SGC7901-MN) (Figura 13).



Figura 13. Capacidad tumorigénica de las células SGC7901 *in vivo*. Las células derivadas de un cultivo en esfera dieron lugar a un tumor de mayor tamaño en comparación a un tumor derivado de células en monocapa.

En 2011, Leenders G. y colaboradores demostraron que la activación de c-Met permite la inducción de un fenotipo tipo troncal en cáncer de próstata. La regulación de genes asociados a células troncales por HGF/c-Met fue validado a través de PCR cuantitativa y FACS, resultando en el aumento de la expresión de CD44 (26%).

Guo T. y colaboradores en el año 2010, analizaron el transcriptoma de diversas líneas celulares, obteniendo que los niveles de la expresión de la proteína c-Met para las líneas celulares de CaG, AGS y NCI-N87 que presentan más copias respecto al control empleado (Figura 14).

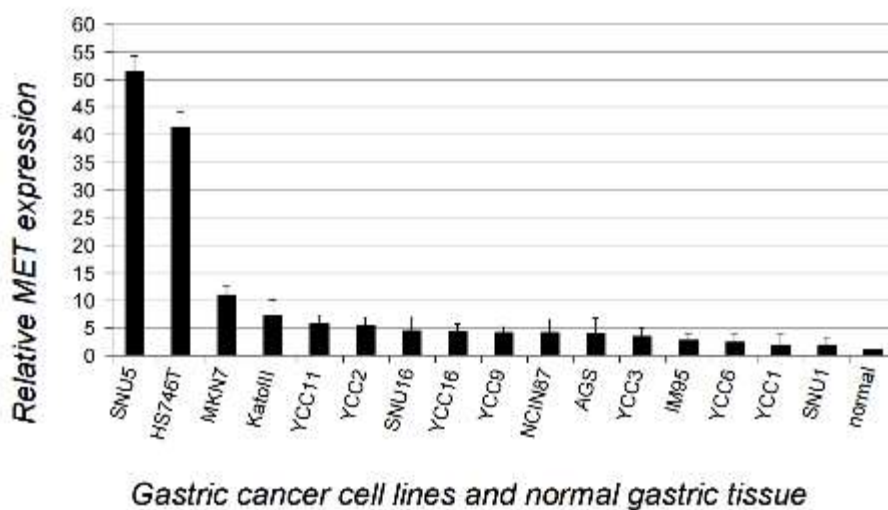


Figura 14. Expresión relativa de c-Met en línea celular AGS y NCI-N87 de CaG. Expresión de ARN mensajero en diversas líneas celulares permite confirmar que en las líneas celulares AGS y NCI-N87 se sobreexpresa c-Met en niveles similares, sin embargo, existen otras líneas como SNU5 Y HS746T, que expresan hasta más de 40 veces más la proteína respecto a los niveles normales.

La amplificación del gen *MET* en diversas líneas celulares de CaG no siempre resulta en la activación de Met por lo que Heindl S. y colaboradores en 2012 mediante western-blot detectaron la fosforilación de los residuos de tirosina Y1234/1235 de Met en lisados celulares totales, no encontrando señal para la línea celular AGS, es decir en estas células no se encuentra activado el receptor (Figura 15).

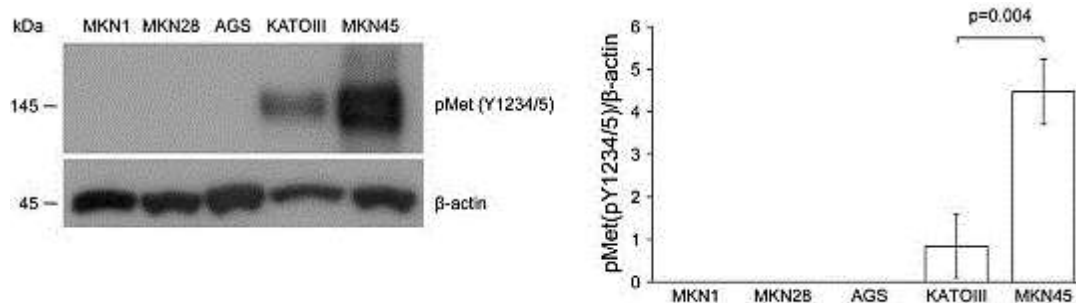


Figura 15. El receptor c-Met inactivo en la línea celular AGS. La fosforilación del receptor no fue detectada en lisados totales de las líneas celulares MKN1, MKN28 y AGS; mientras que KATOIII y MKN45 usando un anticuerpo dirigido contra el residuo de Y1234/1235 de c-MET. La carga igual de las muestras fue confirmada por la detección de β-actina. El promedio de los niveles de fosforilación fueron determinados por el análisis densitométrico y calculados en relación a los niveles del control de carga.

Zhang C. y colaboradores en 2011 identificaron CSC CD44+ CD24+ en la línea celular AGS de CaG; estas células mostraron propiedades de autoregeneración y diferenciación, así como capacidad tumorigénica, siendo suficiente únicamente 200 células de esta población para generar tumores en el 50% de los ratones NOD-SCID empleados en esta investigación.

En 2012, Chen T. y colaboradores identificaron en tejidos y sangre periférica de pacientes con CaG, una población CD44+ CD54+ con la capacidad de

formar esferas; estas células poseen todas las propiedades de CSC como autorenovación, diferenciación y son iniciadoras de tumores.

5. JUSTIFICACIÓN

El CaG se ha convertido en la principal causa de muerte por tumores en nuestro país. De ahí la importancia de conocer más sobre los mecanismos que llevan a esta enfermedad a ser tan mortífera. Uno de estos mecanismos es la invasión, un proceso que ocurre previo a la metástasis.

Sabiendo que las CSC son en parte responsables del desarrollo y progresión del cáncer, es necesario obtener información sobre el papel de las GCSC y la actividad del receptor c-Met en la migración e invasión.

6. HIPÓTESIS

La activación del receptor c-Met está implicada en el mantenimiento de la troncalidad e invasividad de GCSC.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la activación del receptor c-Met y su relación con la troncalidad e invasividad en GCSCs.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Enriquecer la población de GCSC CD44^{high} a través de la generación de esferas de las líneas celulares AGS y NCI-N87
2. Evaluar el estado funcional del receptor c-Met en cultivos enriquecidos de GCSC.
3. Determinar si la activación del receptor c-Met se asocia con la troncalidad de los cultivos enriquecidos en GCSC.
4. Evaluar el potencial tumorigénico y capacidad de invasión de las GCSC derivadas de las líneas celulares AGS Y NCI-N87.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

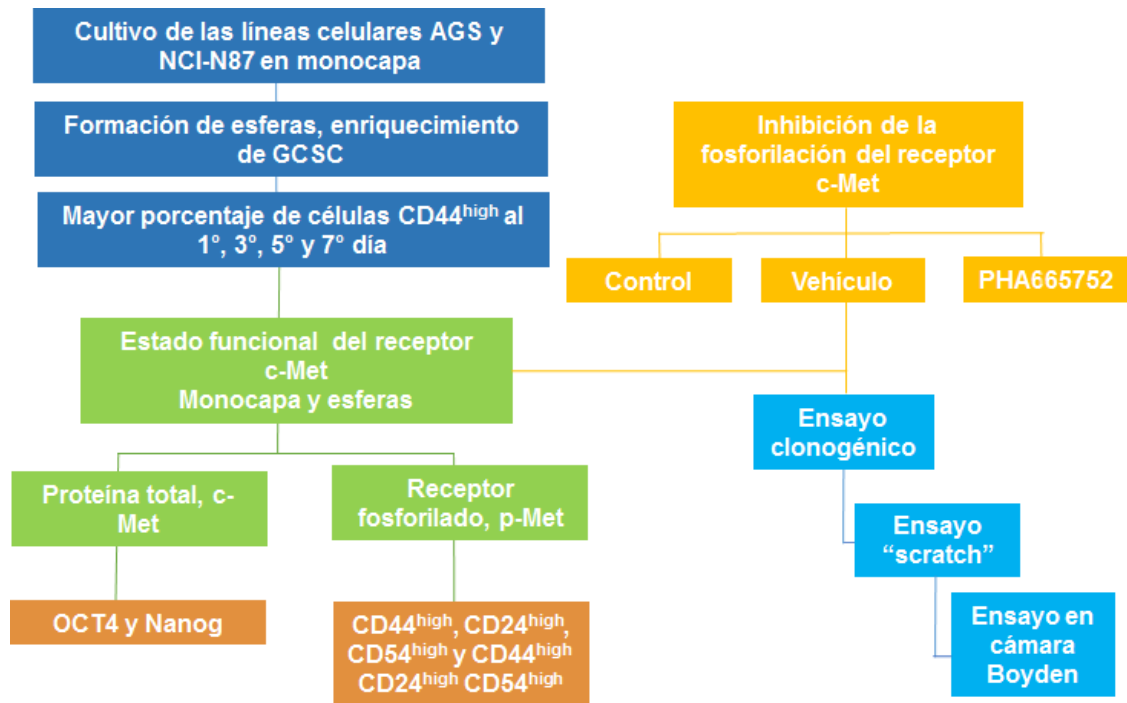


Figura 16. Estrategia experimental planteada. La finalidad de la estrategia es cumplir con el objetivo general y específicos, previamente descritos.

10. METODOLOGÍA

10.1 LINEAS CELULARES

La línea celular AGS presenta una morfología epitelial, se deriva de adenocarcinoma gástrico de una mujer de 54 años, sin tratamiento previo. La línea celular NCI-N87 se deriva de metástasis del hígado, presenta una morfología epitelial y un patrón de crecimiento de formación de colonias; la expresión de marcadores epiteliales/gástricos está confinada solo a subpoblaciones, debido a que es una línea heterogénea compuesta de diversas variantes fenotípicas (Saraiva-Pava K. *et al.*, 2015) (Figura 17).

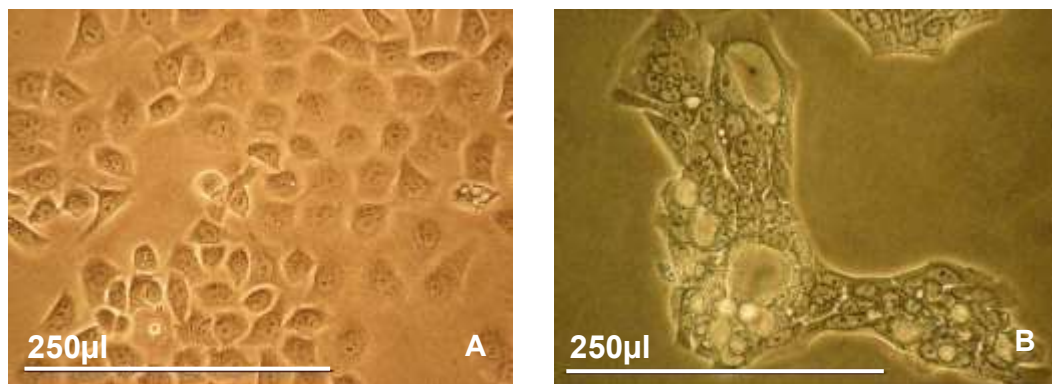


Figura 17. Monocapa de la línea celular AGS y NCI-N87. Cada célula de la línea celular AGS tiene un diámetro aproximado de 40µm, mientras que las células de NCI-N87 son de menor diámetro, entre 16 y 20 µm (40X).

10.1.2 CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA

Las líneas celulares AGS y NCI-N87 se mantuvieron en medio DMEM y RPMI suplementados con 10% suero fetal bovino (SFB) y 1X ampicilina/estreptomicina. Los pasajes se realizaron cuando los cultivos alcanzaron el 70-80% de confluencia con tripsina 0.25% y verseno.

10.1.3 CULTIVO CELULAR EN ESFERAS

Las células a partir de un cultivo en monocapa (MC) fueron separadas empleando 3mL de una dilución 1:1 de tripsina 0.025% y verseno por 5 minutos y resuspendidas en 1ml de PBS para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer y empleando azul de tripano, con la finalidad; de sembrar 8000 células/ml. El cultivo celular se mantuvo en condiciones no adherentes, en un medio condicionado para la formación de esferas (Tabla 3) en una placa Corning® de 6 pozos para evaluar el enriquecimiento del marcador CD44 acoplado a PE (ficoeritrina) (BioLegend, #338807) y en placas p100 previamente tratadas con polihidroxietilmetacrilato (Poly-HEMA, Sigma P3932).

NOMBRE	CONCENTRACIÓN	CARACTERÍSTICAS
DMEM/Ham's F-12		Adicionado con L-Glutamina y 15mM HEPES (Caisson Labs).
B27	1X	Contiene antioxidantes y permite el incremento y la propagación de esferas a más de 20 pases.
EGF (Del inglés, epidermal growth factor)	20µg/ml	La cascada de señalización activada por los factores es esencial para el mantenimiento de las células troncales tumorales.

Tabla 3. Medio de enriquecimiento de esferas.

Al 1º, 3º, 5º y 7º día, las esferas fueron disgregadas empleando verseno por 15 minutos y manualmente (con ayuda de la pipeta de 1000 µl por 50 veces al inicio y al final de la incubación). Las esferas se resuspendieron en 1ml de PBS, se contaron con la cámara Neubauer, se separaron en dos tubos de

microfuga (control sin teñir y CD44) y se realizó un lavado con 300 µl de flow buffer. Las esferas fueron teñidas con el anticuerpo CD44 acoplado a PE e incubadas por 30 minutos a 4°C; mientras que el tubo control sin teñir fue usado como control de autofluorescencia basal de las células. Finalmente, las esferas fueron fijadas con 300 µl de paraformaldehído 4% y analizadas en el citómetro de flujo FacsARIA (BD biosciences).

10.2 MARCAJE PARA CITOMETRÍA CD44, CD24 Y CD54.

A partir del cultivo en monocapa las células fueron tripsinizadas y a partir de esferas las células fueron disgregadas con verseno, en ambos casos, las células se resuspendieron en 1000 µl de PBS, se depositaron 200 µl en 5 tubos de microfuga (control sin teñir, CD44, CD24, CD54 y triple tinción CD44, CD24 y CD54) y se realizó un lavado por centrifugación con 300 µl de flow buffer a 2500 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue retirado. Para la inmunotinción con los anticuerpos primarios, las células fueron resuspendidas en 100 µl de una dilución 1:100 con flow buffer y los anticuerpos primarios por 30 minutos en hielo (Tabla 4).

ANTICUERPOS	FLUOROCROMO ACOPLADO	NO. DE CATÁLOGO BioLegend
CD24	PerCP	311114
CD44	PE	338807
CD54	Pacific Blue	353110

Tabla 4. anticuerpos empleados para la inmunotinción de las proteínas de superficie CD44, CD24 y CD54. Debido a que los fluorocromos se encuentran acoplados, disminuye su unión inespecífica a proteínas de las células.

Se realizó un lavado con 300µl de flow buffer y fijadas al resuspender en 300µl de paraformaldehído 4%. Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FacsARIA (BD BioSciences).

10.3 MARCAJE PARA CITOMETRIA NANOG Y OCT4

A partir del cultivo en monocapa las células fueron tripsinizadas y a partir de esferas las células fueron disgregadas con verseno, en ambos casos, las células se resuspendieron en 900 µl de PBS, se depositaron 300 µl en 3 tubos de microfuga (anticuerpo secundario, Nanog y Oct4) y se realizó un lavado con 300 µl de flow buffer por centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue retirado. Las células fueron permeabilizadas con metanol frío 100% por 15 minutos y posteriormente, se realizó un lavado. Las células fueron incubadas en flow buffer con el anticuerpo primario en 100 µl de una dilución 1:200 a temperatura ambiente por 30 minutos y se realizó un lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario de ratón acoplado al fluorocromo FITC en 50 µl de una dilución 1:200 en hielo por 30 minutos, después, las células fueron fijadas en 300µl de formaldehído 4% y analizadas en el citómetro de flujo FacsARIA (BD biosciences).

10.4 MARCAJE PARA CITOMETRÍA c-Met y p-Met

A partir del cultivo en monocapa las células fueron tripsinizadas y a partir de esferas las células fueron disgregadas con verseno, en ambos casos, las células se resuspendieron en 900 µl de PBS, se depositaron 300 µl en 3 tubos de microfuga (anticuerpo secundario, c-Met y p-Met) y se realizó un lavado por centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue retirado. Para fijar las células, se resuspendieron en 300 µl de formaldehído 4% por 10 minutos, se agregaron 300 µl de buffer de incubación y se centrifugaron a 2500 rpm. Para que el anticuerpo reconociera al receptor a la proteína total c-Met y su fosforilación en el sitio catalítico (Tyr 1234 y 1235), las células fueron

permeabilizadas con metanol 100% por 30 minutos y posteriormente, se realizó un lavado. Las células fueron incubadas en la solución de incubación con el anticuerpo primario en 100 μ l de una dilución 1:200 a temperatura ambiente por una hora y se realizó un lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario de conejo acoplado al fluorocromo FITC en 50 μ l de una dilución 1:200 en hielo por 30 minutos. Las células fueron resuspendidas en 300 μ l de PBS.

10.5 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Se sembraron 500 células provenientes de cada tratamiento en cajas de 6 pozos en condiciones de adherencia y con medio DMEM o RPMI suplementado con 10% SFB. Después de 10 días, las células se fijaron con una solución de metanol y ácido acético 1:1 por 40 minutos y se tiñeron con cristal violeta al 0.005% por 40 minutos, se realizaron lavados con agua corriente para retirar el exceso de colorante. Las colonias (más de 50 células) fueron contadas manualmente a través de un microscopio invertido simple Nikon ECLIPSE TS100, con el objetivo 10X. Cada condición experimental fue repetida 3 veces.

10.6 ENSAYO SCRATCH

Se siguió la metodología reportada en 2010 por Navarro-Tito N. & colaboradores. Las células crecieron en medio DMEM o RPMI suplementado con SFB 10% hasta alcanzar una confluencia de 90 a 100%, momento en el que se realizó el cambio de medio DMEM por 12 horas; para minimizar la proliferación celular, pero es suficiente para prevenir la apoptosis y que las células se despeguen. Adicionalmente, las células fueron tratadas con mitomicina C 12 μ M por 2 horas, para inhibir la proliferación durante el experimento. Posteriormente, se realizó la herida usando una punta de pipeta de 200 μ l, se realizaron tantos lavados con PBS fueran suficientes para

remover las células suspendidas, y se adiciono el medio. El progreso de la migración celular fue fotografiado a las 24 y 48 horas usando un microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100, acoplado a una cámara Nikon COLPIX S100. Cada condición experimental fue repetida 3 veces.

10.7 ENSAYO DE INVASIÓN

Una cámara de invasión con matrigel de 24 pocillos, con poro de 8.0 μm (Corning ® Matrigel Invasion Chamber #354480) fue hidratada con 100 μl de medio DMEM-F12 por 2 horas en la incubadora de células. Se colocaron 600 μl de DMEM-F12 suplementado con 10% SFB (quimioatrayente) en el fondo de la cámara. 100 000 células provenientes de cultivos en monocapa (cosechadas únicamente con verseno) y esferas en 100 μl en medio DMEM-F12 se colocaron en las canastillas de la cámara y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, se fijó la membrana de matrigel y el fondo de la cámara con metanol: ácido acético por 40 min a temperatura ambiente. La tinción se llevó a cabo con cristal violeta 0.05 % por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada hasta que el exceso de colorante fue eliminado. Las células que migraron fueron contadas en 5 campos, con ayuda un microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100, acoplado a una cámara Nikon COLPIX S100, las fotografías fueron tomadas a un aumento de 40X y máximo zoom.

10.8 ESTADISTICA

El análisis se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA), con significancia del 5%. Los resultados se representan como la media \pm Desviación estándar (SD). Un valor de p menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo, los cuales se muestran como asteriscos.

11 RESULTADOS

11.1 ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS TIPO TRONCAL (MARCADOR CD44^{high}) EN LA LÍNEA CELULAR AGS

Analizamos el marcador CD44^{high} debido a que esta población ha mostrado capacidad de autorenovación y de dar lugar a una progenie diferenciada; estas capacidades son consistentes con el fenotipo de una CSC (Talaishi S., *et al*, 2009). Con la finalidad de obtener cultivos con un mayor porcentaje de células CD44^{high} se sembraron 8000 células por ml, en condiciones no adherentes y en un medio suplementado para la formación de esferas (sin suero fetal bovino). Se analizó el porcentaje de células CD44^{high} a partir de un cultivo en monocapa (MC) (suplementado con suero fetal bovino), al 1°, 3°, 5° y 7° día de cultivo para la formación de esferas. A través del análisis por citometría de flujo (Figura 18), el mayor porcentaje de células CD44^{high} se obtuvo al 3° día de enriquecimiento, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$) respecto al cultivo en MC (Figura 19).

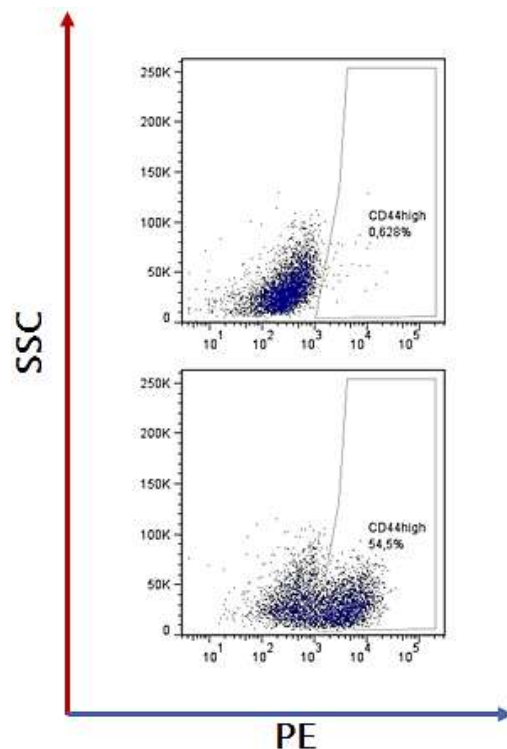


Figura 18. Mayor porcentaje de células CD44^{high} obtenido al 3° día de cultivo en esfera para la línea celular AGS a través de citometría de flujo. Al analizar granularidad y las unidades relativas de fluorescencia detectadas para el fluorocromo PE, respecto al control (sin teñir) las células marcadas con el anticuerpo CD44 acoplado a PE se desplazan hacia la derecha, aumentando los niveles de expresión de esta proteína en la población celular, observado en el aumento de las unidades relativas de fluorescencia registradas a través de citometría de flujo.

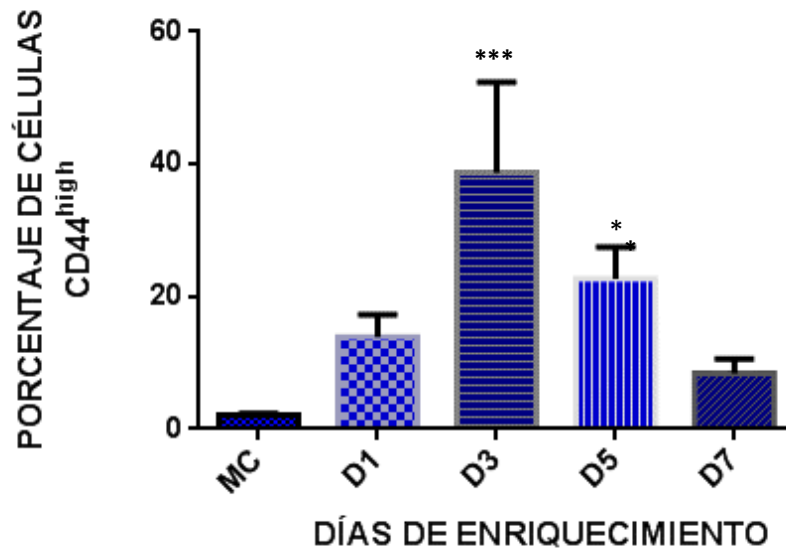


Figura 19. Enriquecimiento de células CD44^{high} al tercer día de cultivo de formación de esferas. El porcentaje de células CD44^{high} fue analizado por citometría de flujo a través de la fluorescencia emitida por el anticuerpo CD44 acoplado a PE. La diferencia entre las medias es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). El examen de comparaciones múltiples de Dunnett muestra que el porcentaje obtenido al 3° (***) y 5° (**) día son significantes respecto a MC.

La cinética de enriquecimiento de células con el marcador CD44^{high} de la línea celular NCI-N87 se realizó anteriormente en el equipo de trabajo y correspondió al 3er día y al 10%. Sabiendo que, al tercer día obtenemos una población enriquecida con el marcador CD44^{high} que se relaciona con el fenotipo de célula troncal, en adelante, cuando nos referimos a una esfera, esta fue obtenida al tercer día de enriquecimiento, tanto para la línea celular AGS (Figura 20) como para N87 (Figura 21). Las esferas obtenidas no pasan los 250 μm por lo que pueden ser consideradas como esferas.

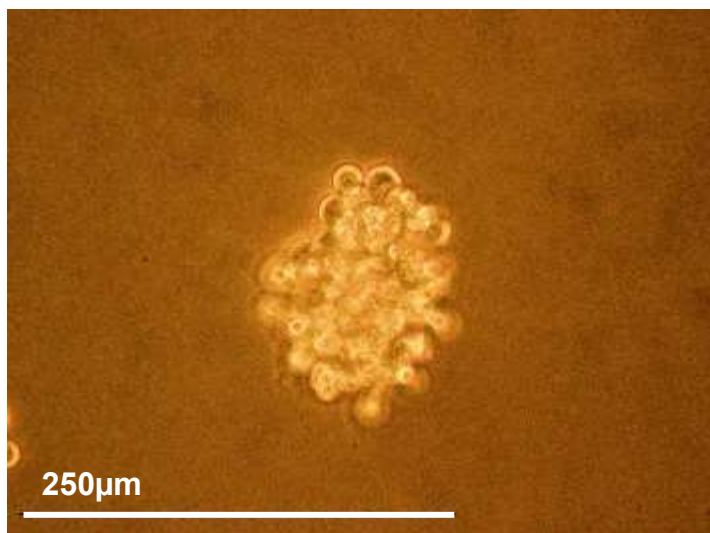


Figura 20. Esfera de la línea celular AGS al tercer día de enriquecimiento del marcador CD44^{high}. Esta esfera tuvo un diámetro aproximado de 120 µm y no sobrepasa los 250 µm necesarios para considerarse como una esfera (Analizado con ImageJ) (40X).

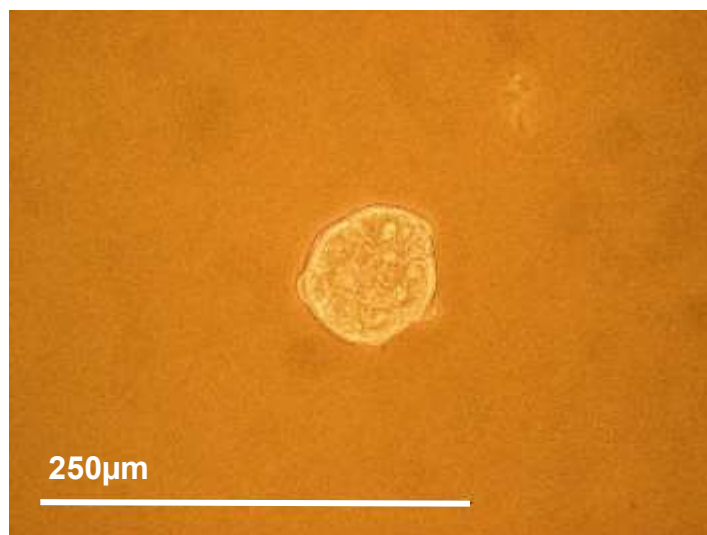


Figura 21. Esfera de la línea celular NCI-N87 al tercer día de enriquecimiento del marcador CD44^{high}. Esta esfera tuvo un diámetro aproximado de 84µm y no sobrepasa los 250 µm necesarios para considerarse como una esfera. (Analizado con ImageJ) (40X).

11.2 EVALUACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL DEL RECEPTOR c-Met EN CULTIVOS ENRIQUECIDOS DE GCSC.

Debido a que, Yang L y colaboradores en 2011 determinaron que las células derivadas de esferas tumorales de la línea celular SGC7901 exhibieron mayor potencial tumorigénico y capacidad multipotente de diferenciación *in vivo* en comparación a células provenientes de un cultivo en monocapa; nuestro interés fue saber si se presentan diferencias entre las células provenientes de un cultivo en monocapa y de un cultivo en esferas, respecto a los cambios en la activación o en el aumento de la fosforilación del receptor c-Met.

En la línea celular AGS y en un cultivo es esfera el receptor c-Met fue fosforilado o activado (Figura 22 y 23).

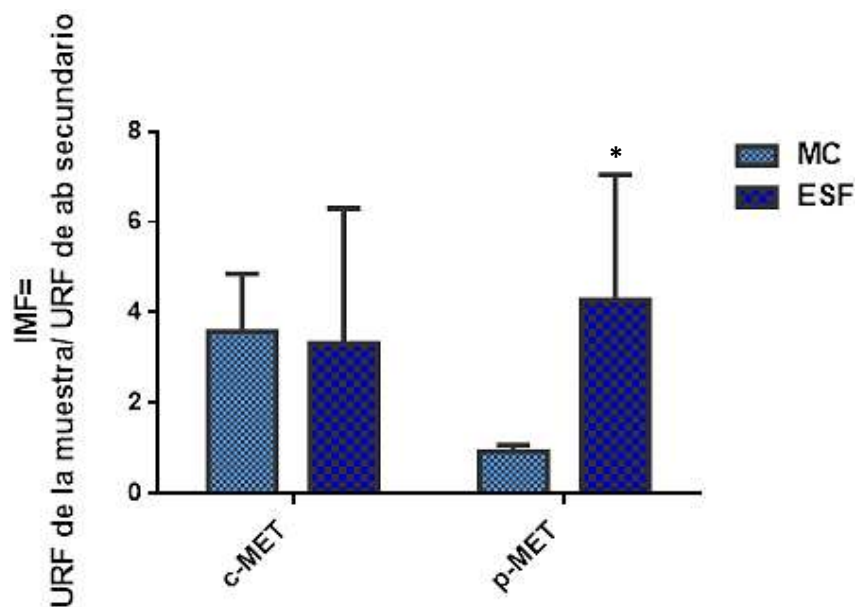


Figura 22. Estado funcional del receptor c-Met en la línea celular AGS en cultivo en monocapa y esfera. Es sabido que la monocapa de esta línea celular no presenta el receptor activado o fosforilado aunque presenta más copias del receptor en comparación a células no transformadas, sin embargo al analizar el Índice Medio de Fluorescencia (IMF), no encontramos una diferencia significativa entre c-Met en monocapa y en esfera, pero si una diferencia significativa en la activación del receptor en un cultivo enriquecido en GCSC, respecto a un cultivo en monocapa.

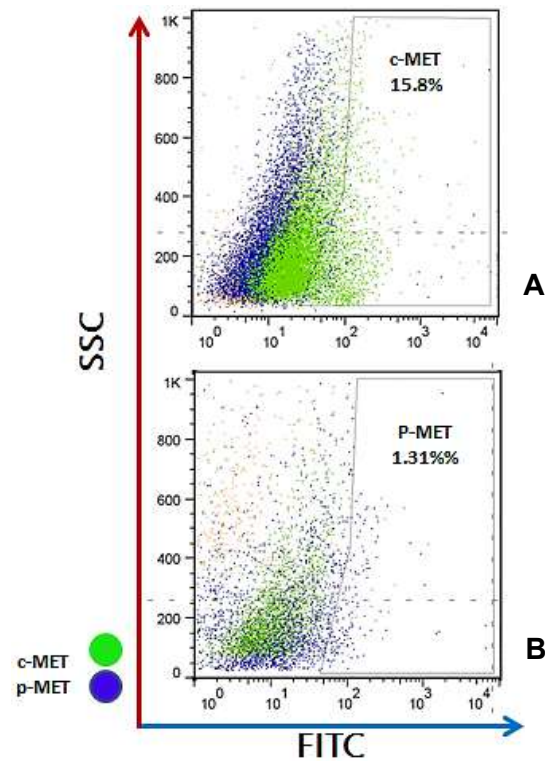


Figura 23. Dot-plot de la población c-Met y p-Met en un cultivo en monocapa (A) y un cultivo en esfera (B) de la línea celular AGS. Al analizar granularidad y las unidades relativas de fluorescencia detectadas para el fluorocromo FITC, las células que expresan mayor cantidad de la proteína c-Met (color verde) se desplazan hacia la derecha (15.8% de la población analizada), es decir tienen mayor fluorescencia, mientras que la población p-Met (color azul marino) se encuentra por detrás y a la par con el control empleado (anticuerpo secundario). Al analizar el cultivo en esfera, se observa un desplazamiento hacia la derecha, es decir una mayor fluorescencia detectada para la población p-Met (1.31% de la población analizada), lo que constituye la activación del receptor en un cultivo enriquecido en GCSC.

Mientras que en la línea celular NCI-N87 en un cultivo en esfera se observó el incremento en la fosforilación del receptor, respecto a un cultivo en monocapa (Figura 24 y 25).

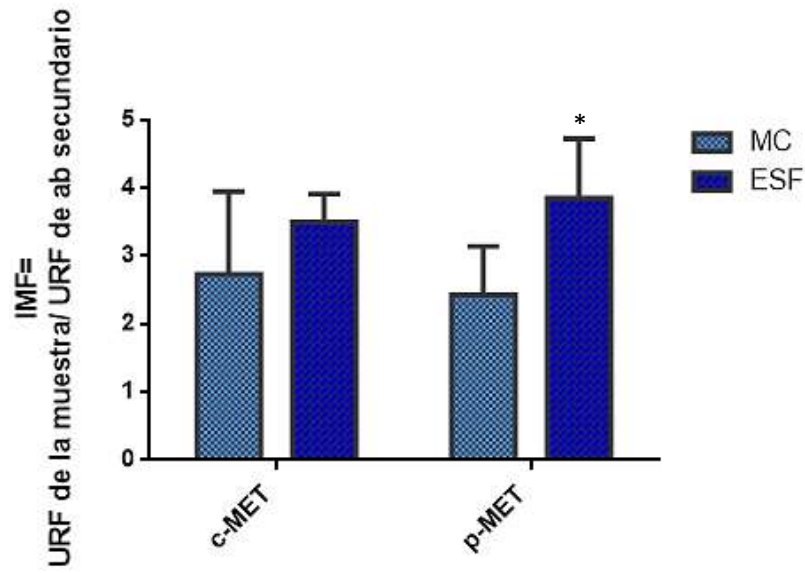


Figura 24. Estado funcional del receptor c-Met en la línea celular AGS en cultivo en monocapa y esfera. Es sabido que la monocapa de esta línea celular presenta el receptor activado o fosforilado, sin embargo, al analizar el Índice Medio de Fluorescencia (IMF) no encontramos una diferencia significativa entre c-Met en monocapa y en esfera, pero si, un aumento significativo en la activación del receptor en un cultivo enriquecido en GCSC respecto a un cultivo en monocapa.

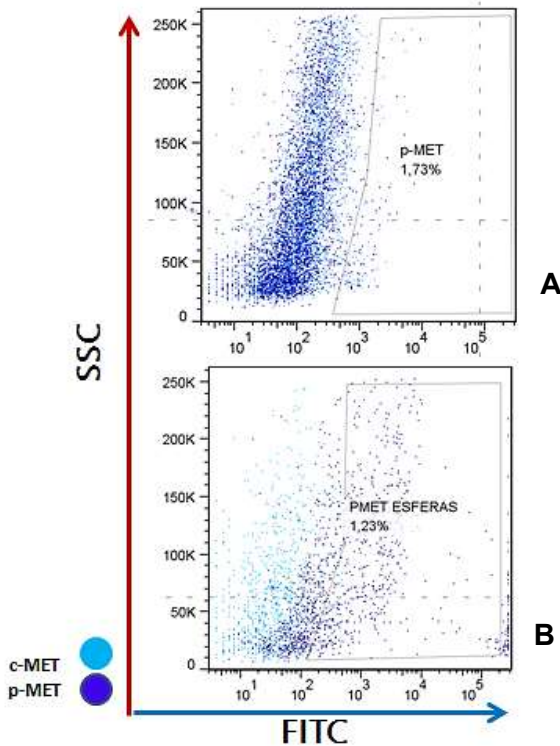


Figura 25. Dot-plot de la población c-Met y p-Met en un cultivo en monocapa (A) y un cultivo en esfera (B) de la línea celular NCI-N87. Al analizar granularidad y

las unidades relativas de fluorescencia detectadas para el fluorocromo FITC, las células que expresan la proteína c-Met (color azul cielo) se encuentran a la par con la fluorescencia detectada para p-Met (color azul marino) (1.73% de la población analizada). Al analizar el cultivo en esfera, se observa un desplazamiento hacia la derecha, es decir una mayor fluorescencia detectada para la población p-Met (1.23% de la población analizada), lo que constituye la activación del receptor en un cultivo enriquecido en GCSC.

11.3 EVALUACIÓN DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR c-Met Y LA TRONCALIDAD DE LOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN GCSC.

Para evaluar esta asociación, el primer paso fue bloquear la activación (fosforilación) del receptor c-Met en ambas líneas celulares, AGS (Figura 26) y NCI-N87 (Figura 27), para lo que se empleó el inhibidor PHA-665752 (SIGMA, PZ0147) de Pfizer, en cultivos en monocapa por 72 horas a una concentración de 500 μ M. PHA-665752 evita la fosforilización del sitio catalítico del receptor c-Met y que tiene impacto en el crecimiento, en la actividad de diversas vías de señalización, arresto celular, apoptosis y movilidad celular. PHA-665752 es 50 veces más selectivo en comparación a otros inhibidores.

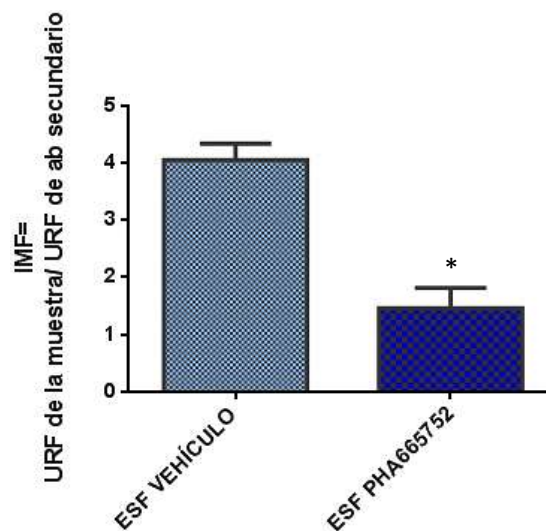


Figura 26. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met en esferas de la línea celular AGS. El inhibidor se aplicó en un cultivo en monocapa por 72 horas, tras el

cultivo en esfera, se analizó la Intensidad de Fluorescencia Media Relativa y se observó una disminución significativa en la fosforilación del receptor.

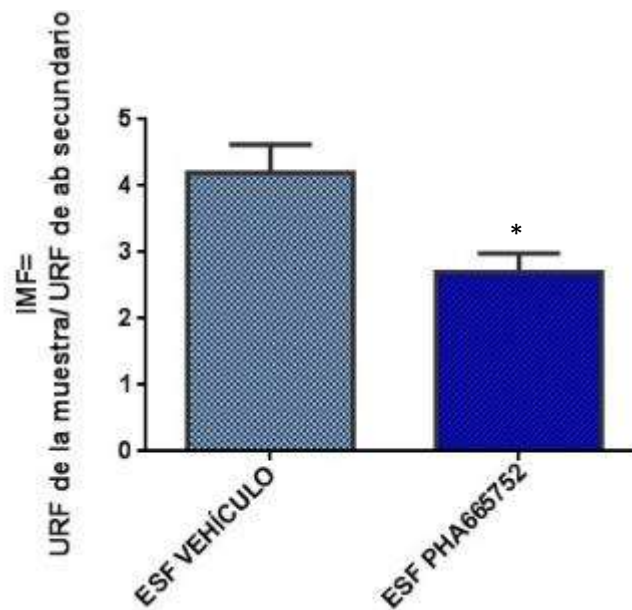


Figura 27. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met en esferas de la línea celular NCI-N87. El inhibidor se aplicó en un cultivo en monocapa por 72 horas, tras el cultivo en esfera, se analizó la Intensidad de Fluorescencia Media Relativa y se observó una disminución significativa en la fosforilación del receptor.

Para establecer una posible asociación del receptor c-Met y el mantenimiento del estado de troncalidad caracterizado por la regulación de Nanog y Oct4 se cultivaron las células con PHA-665752, se formaron esferas y se realizó el análisis por citometría de flujo, observando una disminución de la expresión de Nanog (Figura 28) y Oct4 (Figura 29) en la línea celular AGS, respecto a un cultivo en esfera que proviene de un cultivo en monocapa con el vehículo.

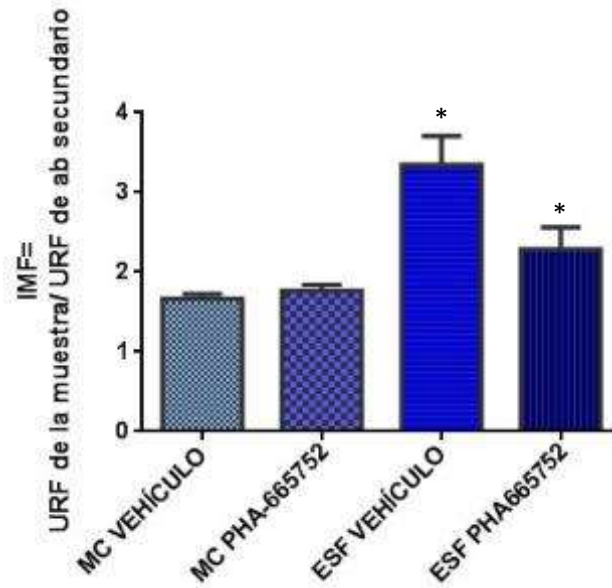


Figura 28. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Nanog en la línea celular AGS. Nanog se expresa en monocapa en bajos niveles, sin embargo, en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC aumenta significativamente su expresión respecto a un cultivo en monocapa y al inhibir la fosforilación del receptor (PHA-665752), la expresión de Nanog disminuye significativamente, respecto al cultivo en esferas con el vehículo.

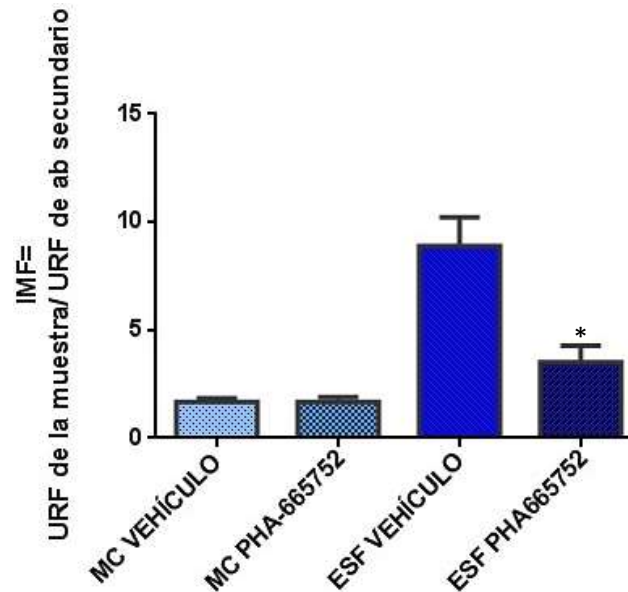


Figura 29. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Oct4 en la línea celular AGS. Oct4 tiene un nivel de expresión mínimo en monocapa, sin embargo, en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC aumenta significativamente su expresión respecto a un cultivo en monocapa y al inhibir la

fosforilación del receptor (PHA-665752), la expresión de Oct4 disminuye significativamente, respecto al cultivo en esferas con el vehículo.

En la línea celular NCI-N87 se observó una disminución de la expresión de Nanog (Figura 30) y Oct4 (Figura 29) en la línea celular AGS, respecto a un cultivo en esfera que proviene de un cultivo en monocapa con el vehículo.

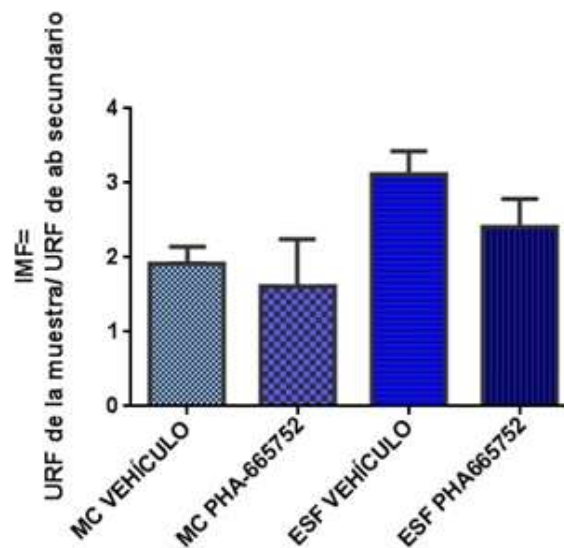


Figura 30. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Nanog en la línea celular NCI-N87 Nanog se expresa en monocapa en bajos niveles, sin embargo, en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC aumenta significativamente su expresión respecto a un cultivo en monocapa y al inhibir la fosforilación del receptor (PHA-665752), la expresión de Nanog disminuye significativamente, respecto al cultivo en esferas con el vehículo.

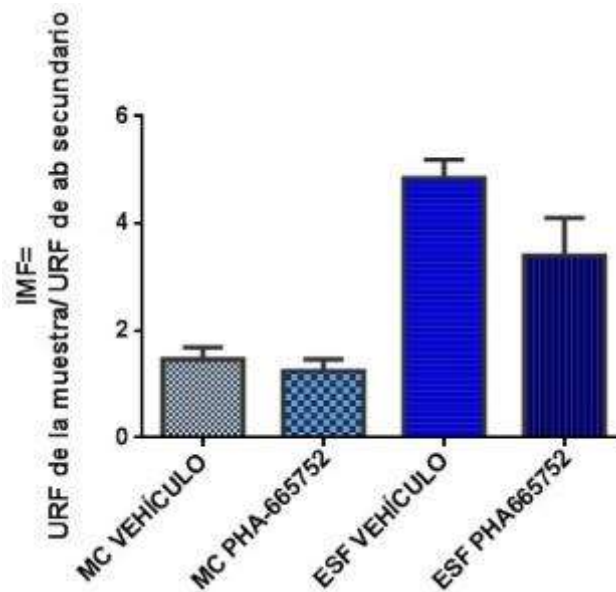


Figura 31. Asociación entre el estado funcional del receptor c-Met y la expresión de Oct4 en la línea celular NCI-N87. Oct4 tiene un nivel de expresión mínimo en monocapa, sin embargo, en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC aumenta significativamente su expresión respecto a un cultivo en monocapa y al inhibir la fosforilación del receptor (PHA-665752), la expresión de Oct4 disminuye significativamente, respecto al cultivo en esferas con el vehículo.

11.4 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TUMORIGÉNICO Y CAPACIDAD DE INVASIÓN DE LAS GSCS DERIVADAS DE LAS LÍNEAS CELULARES AGS Y NCI-N87.

11.4.1 ENSAYO CLONOGÉNICO

Se realizó este ensayo para conocer la capacidad de una sola célula para formar una colonia (formada por al menos 50 células), cabe mencionar que solo una fracción de células sembradas retiene la capacidad de producir colonias y esta capacidad se asocia al potencial tumorigénico, relacionado con CSC.

Se sembraron 500 células provenientes de cultivos en monocapa y en esfera de las líneas celulares AGS y NCI-N87, de diferentes tratamientos (vehículo y PHA-665752) en medio DMEM o RPMI suplementado con SFB al 10% y se dejó incubar por 10 días, posteriormente se contaron las colonias formadas.

Es posible observar una diferencia en la morfología de las colonias respecto a una colonia que proviene de un cultivo en monocapa (Figura 32) y un cultivo en esfera (Figura 28A), por ejemplo, una colonia de cultivo en monocapa es compacta, mientras que la colonia de un cultivo en esfera, presenta el fenotipo “colibrí” o “transición epitelio mesénquima” en el que las células de la colonia están dispersas y son elongadas debido a los re-arreglos en el citoesqueleto, por lo que estas características se relacionan con un fenotipo invasivo (Figura 33A, B y C). Lo anterior nos permite sugerir que los cultivos en esfera enriquecidos en GCSC presentan un fenotipo invasivo.

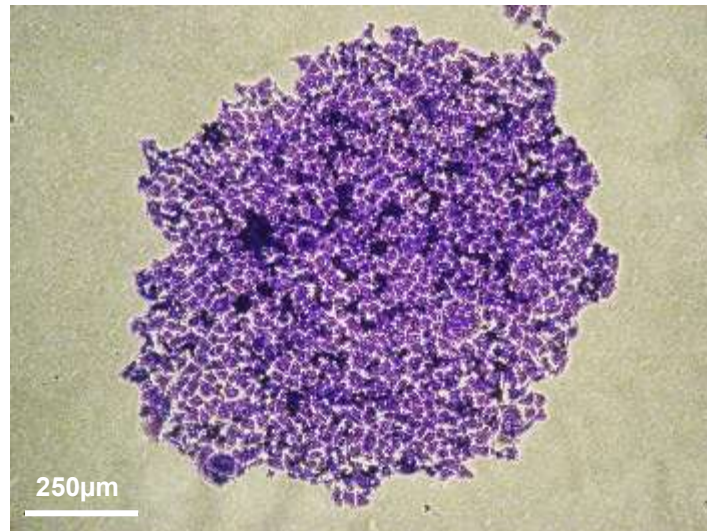


Figura 32. Colonia formada a partir de un cultivo en monocapa de la línea celular AGS. La fijación y tinción con cristal violeta se realizó al 10° día de incubación, estas colonias se caracterizan principalmente por ser compacta y presenta un diámetro aproximado de 1.118 milímetros (4X).

Por otra parte, al comparar la morfología de una colonia proveniente de un cultivo en esfera (vehículo) con el cultivo con el inhibidor, fue posible observar que las colonias con PHA-665752 son más compactas que las colonias control, y que el fenotipo “colibrí” o “transición epitelio mesénquima” no es tan evidente.

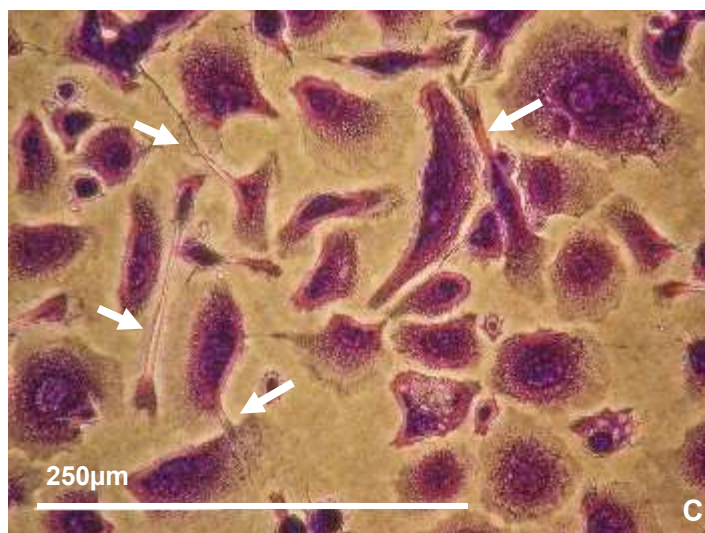
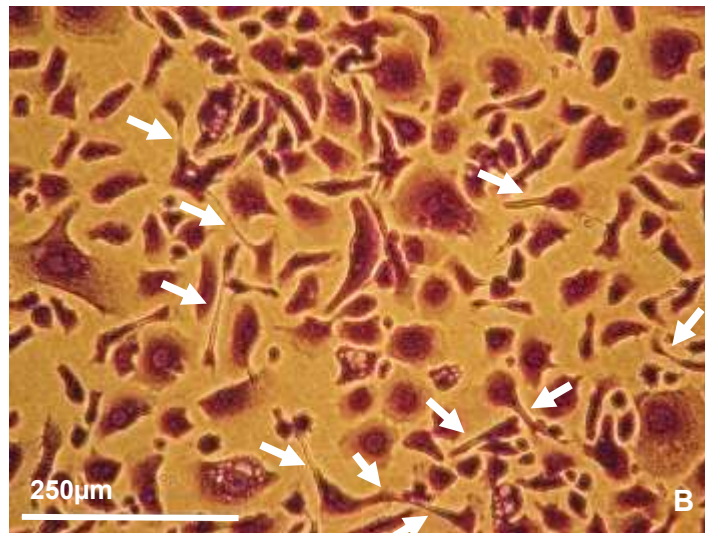
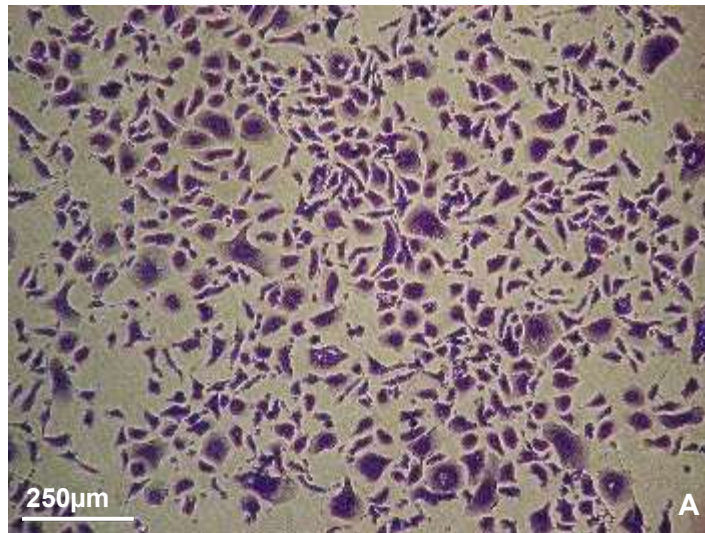


Figura 33. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (vehículo) de la línea celular AGS. La fijación y tinción con cristal violeta se realizó al 10° día de incubación, estas colonias se caracterizan principalmente por presentar un fenotipo “colibrí” o “transición epitelio mesénquima” que se refiere a células dispersas y alargadas (flechas blancas) por rearrreglos en el citoesqueleto; en comparación a la monocapa que muestra colonias compactas (4X A, 10X B y 40X C).

Finalmente, al analizar los datos, observamos que el número de colonias formadas disminuye significativamente en los cultivos en esfera con PHA-665752 (Figura 34), y con la misma tendencia, la eficiencia de plaqueo, es decir el porcentaje de células que da lugar a una colonia en cada tratamiento, con el inhibidor (12.8%), respecto al vehículo (8%) (Figura 35).

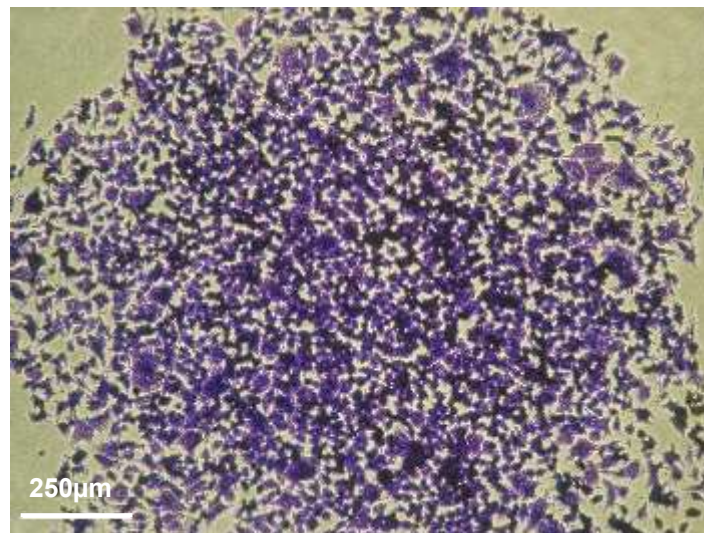


Figura 34. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (inhibidor) de la línea celular AGS. La fijación y tinción se realizó al 10° día de incubación, estas colonias a pesar de que no son tan compactas como las formadas a partir de cultivos en monocapa, tampoco se muestran dispersas ni alargadas como en colonias obtenidas a partir de un cultivo en esfera (vehículo) (4X).

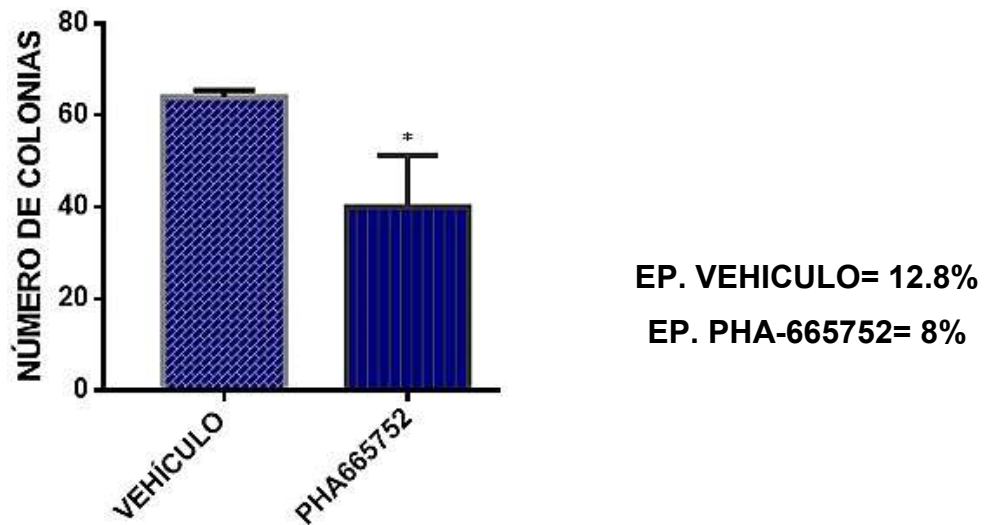


Figura 35. Análisis del ensayo clonogénico para la línea celular AGS. El número de colonias formadas fue significativamente menor en un cultivo en esfera con PHA-665752, respecto a un cultivo control (vehículo). La eficiencia de plaqueo fue menor cuando el inhibidor estaba presente (8%), respecto al control (12.8%)

El ensayo clonogénico en la línea celular NCI-N87 en monocapa no dió lugar a la formación de colonias, solo a pequeños grupos de estas (Figura 36), sin embargo, del cultivo derivado de esferas si se obtuvieron colonias (Figura 37), aunque no fue posible observar diferencias morfológicas.



Figura 36. Ensayo clonogénico en un cultivo en monocapa de la línea celular NCI-N87. Después de 10 días de incubación se encontraron grupos de células que no formaron colonias (4X).

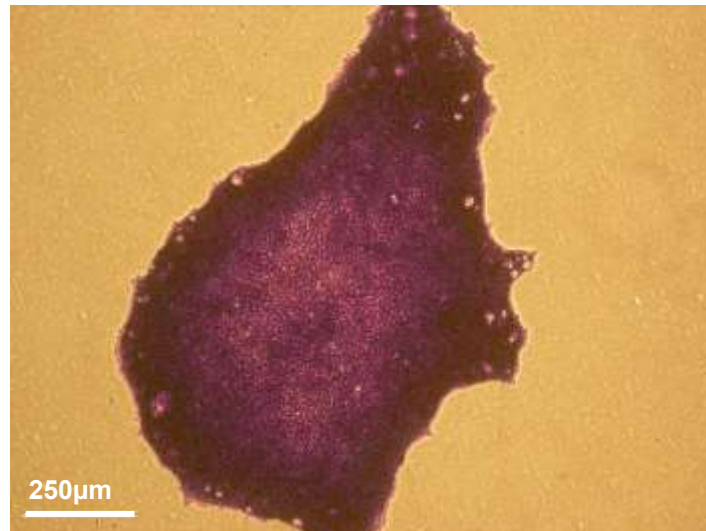


Figura 37. Colonia formada a partir de un cultivo en esfera (inhibidor) de la línea celular NCI-N87. La fijación se realizó al 10° día de incubación, cabe destacar que el crecimiento de esta línea celular es demasiado lento, y que una colonia de este tamaño se obtiene tras un largo periodo de cultivo (4X).

Las colonias formadas de un cultivo en esfera con el inhibidor no mostraron diferencias morfológicas, pero si una disminución significativa en el número de colonias formadas, respecto al cultivo control (Figura 38).

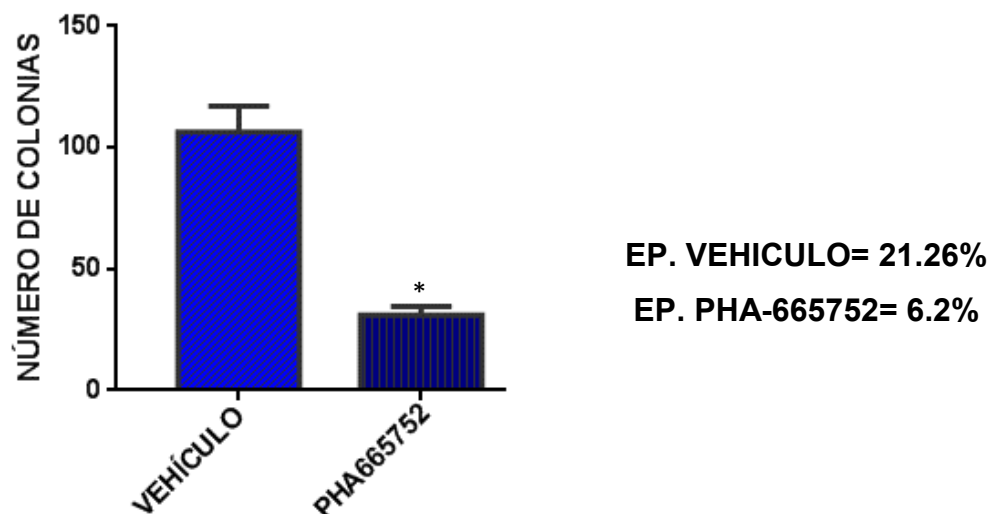


Figura 38. Análisis del ensayo clonogénico para la línea celular NCI-N87. El número de colonias formadas fue significativamente menor en un cultivo en esfera con PHA-665752, respecto a un cultivo control (vehículo). La eficiencia de plaqueo fue menor cuando el inhibidor estaba presente (6.2%), respecto al control (21.26%).

11.4.2 ENSAYO DE MIGRACIÓN

Para la realización del ensayo de cierre de herida se empleó como control negativo a la línea celular HaCat. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (Figura 39). Este ensayo se realizó únicamente para la línea celular AGS, debido a que la línea celular N87 crece en colonias, y se extiende en la caja de cultivo, forma una serie de puntos distribuidos por toda la caja y al pasar la punta de la pipeta, esta arrastra las colonias enteras.

La monocapa de la línea celular AGS tiene la capacidad de migrar (Figura 40), y se tomaron fotografías al momento de hacer la herida (Figura 40A), a las 24 (Figura 40B) y a las 48 horas (Figura 40C), y el análisis posterior (Figura 41).

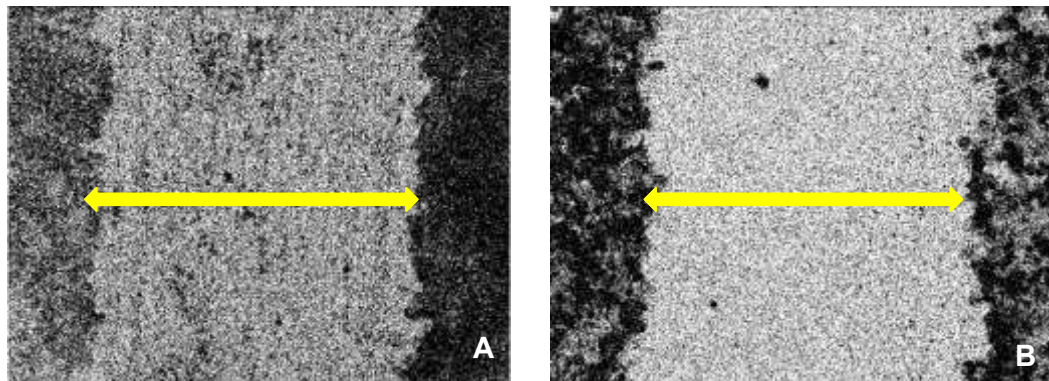


Figura 39. Control negativo del cierre de herida. La línea celular HaCat fue empleada como control negativo y es posible observar que ninguna célula migro a las 24 (A) y 48 horas (B). Imágenes analizadas con Image J.

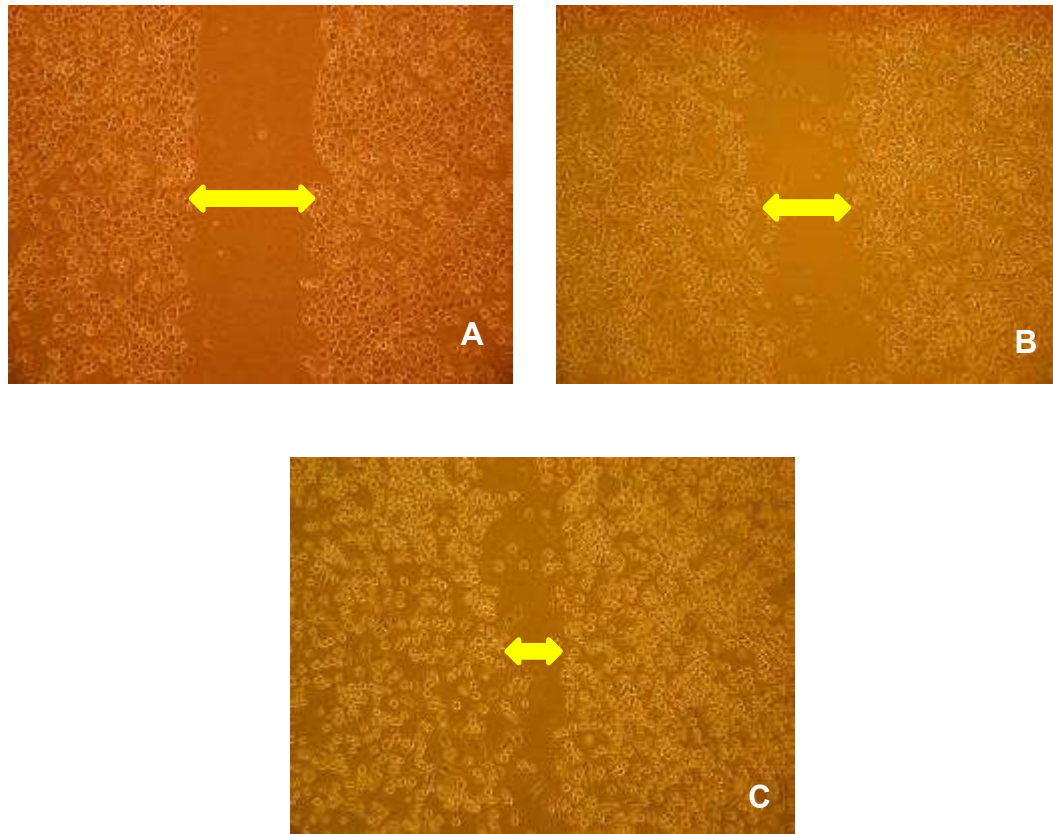


Figura 40. Ensayo scratch de la monocapa de la línea celular AGS. La línea celular AGS tiene la capacidad de migrar, por la actividad de metaloproteasas degradan la matriz extracelular y avanzan en la caja de cultivo hacia el espacio disponible a las 0 (A), 24 (B) y 48 horas (C).

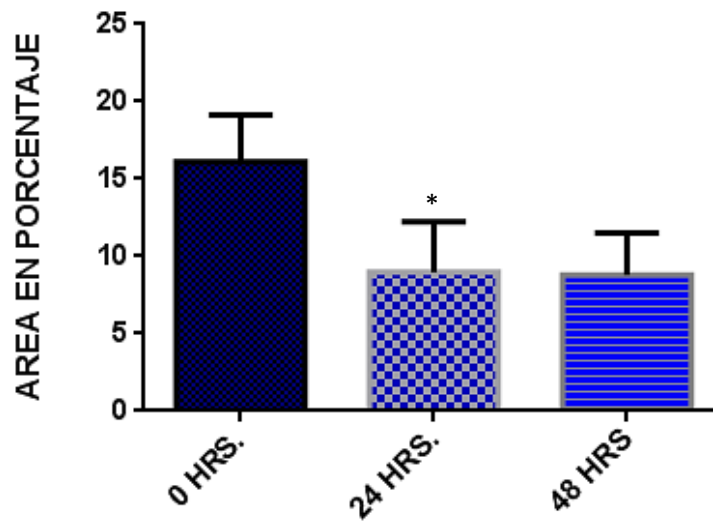


Figura 41. Análisis de ensayo scratch. La línea celular AGS es capaz de migrar (área en porcentaje) y resulta ser significativa a las 24 horas, respecto al inicio del

ensayo, y hasta las 48 horas, sin embargo, la diferencia entre 24 y 48 horas no es significativa.

Las células derivadas de un cultivo en esfera de la línea celular AGS con el vehículo y el inhibidor no mostraron la capacidad de migrar en un lapso de 24 a 48 horas.

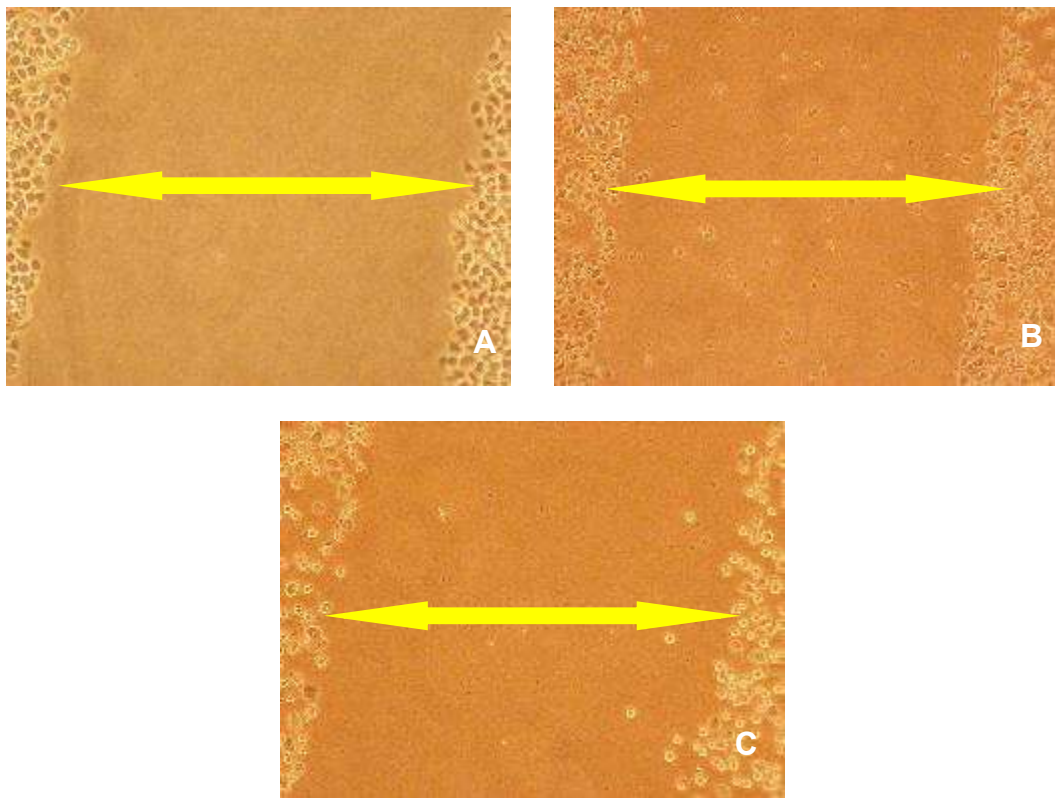


Figura 42. Ensayo scratch de células derivadas de un cultivo en esfera de la línea celular AGS con vehículo. Estas células no tienen la capacidad de migrar a las 0 (A), 24 (B) y 48 horas (C).

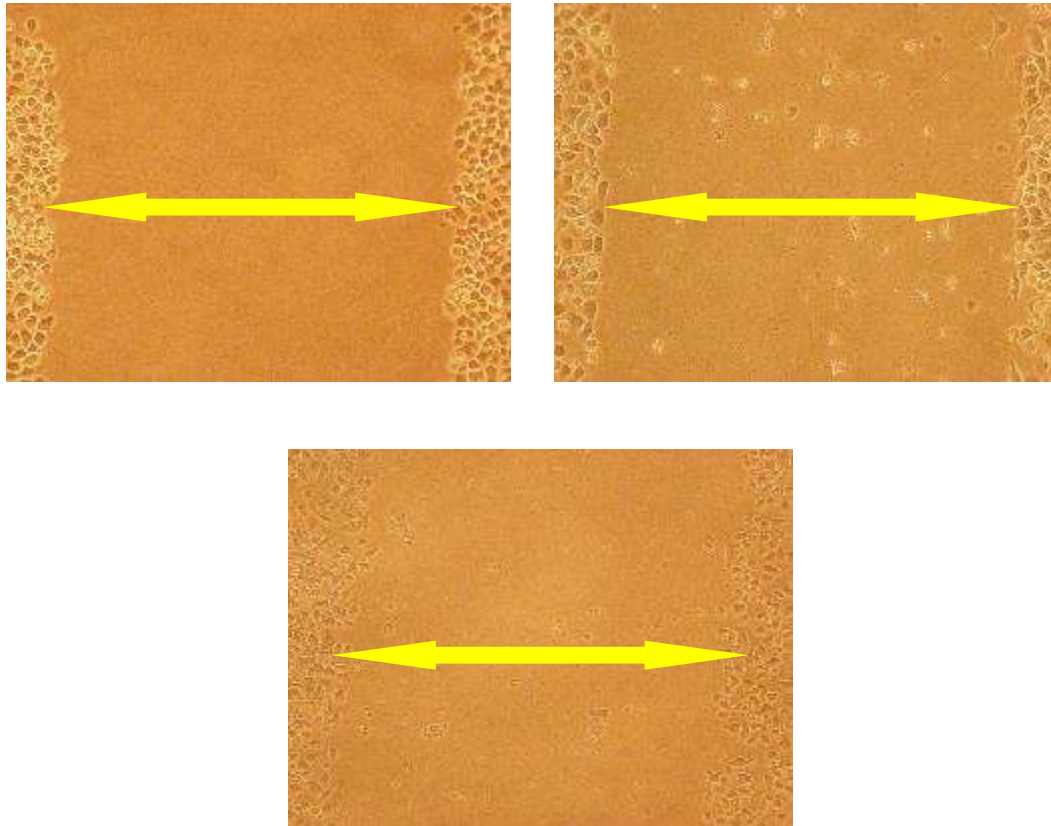


Figura 43. Ensayo scratch de células derivadas de un cultivo en esfera de la línea celular AGS con inhibidor de c-Met. Estas células no tienen la capacidad de migrar a las 0 (A), 24 (B) y 48 horas (C).

11.4.3 ENSAYO DE MIGRACIÓN

La migración fue medida por la migración direccional quimiotáctica por el uso de cámara de invasión de 24 pocillos con matrigel, con poro de $8.0\mu\text{m}$ (Corning® Matrigel Invasion Chamber #354480). 100 000 células fueron depositadas en $100\mu\text{l}$ en la canastilla e incubadas por 24 horas. Las células que no migraron fueron removidas con un hisopo. Las células que migraron hacia el fondo de la membrana fueron contadas y fotografiadas (40X). El control positivo fueron células transfectadas con RAS y cedidas por el Dr. Enrique Pérez; mientras que el control negativo fue sembrado en las mismas condiciones en medio sin SFB (Figura 37).

El conteo de las células que migraron a partir de un cultivo en esfera de la línea celular AGS no mostró diferencias significativas respecto a un cultivo

que contenía PHA-665752 (Figura 38 y 39). Mientras que, ninguna célula derivada de un cultivo en esfera de la línea celular NCI-N87 con el vehículo y con PHA-665752 tuvo la capacidad de invadir.

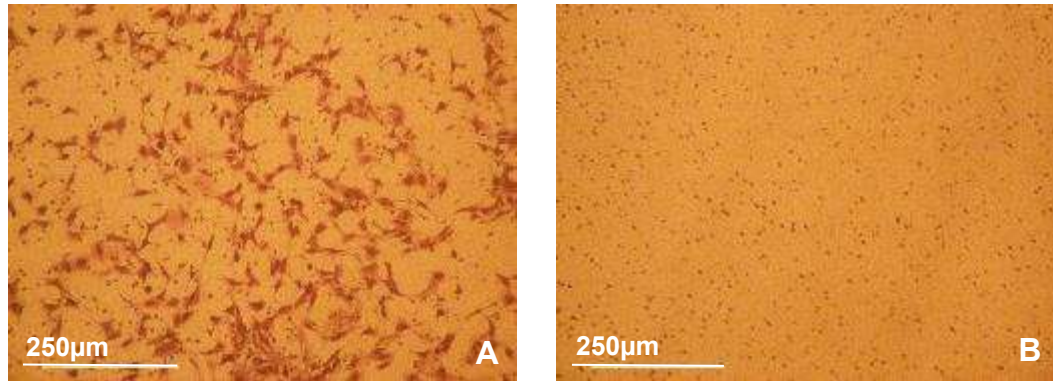


Figura 44. Control positivo y negativo del ensayo de invasión. Se emplearon fibroblastos transfectados con Ras como control positivo (A) y como control negativo (B) al fondo de la cámara, únicamente medio, sin SFB.

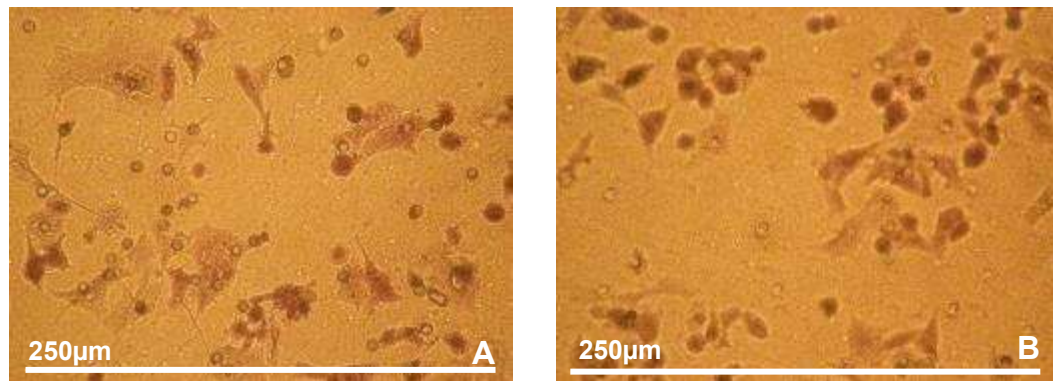


Figura 45. Ensayo de invasión de la línea celular AGS. Las células derivadas de un cultivo esfera con el vehículo (A) y el inhibidor (B), tienen la capacidad de invadir, es decir son capaces de atravesar la membrana de matrigel, por acción de metaloproteasas.

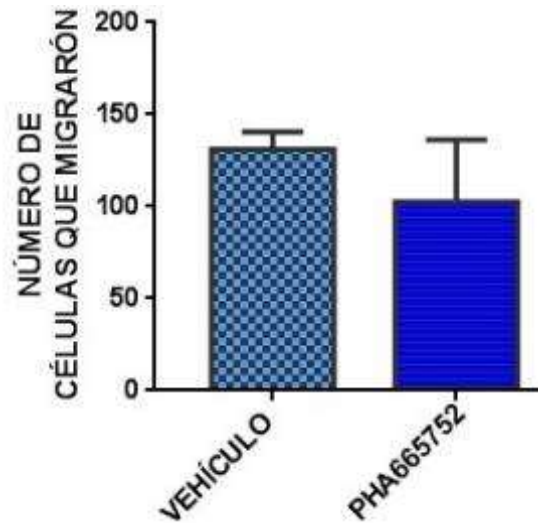


Figura 46. Análisis del ensayo de migración de la línea celular AGS. Las células que migraron fueron contadas manualmente y no se observó diferencia significativa en la capacidad de migración de las células derivadas de cultivos en esferas, que contenían el vehículo y PHA-665752.

12 DISCUSIÓN

Recientemente, la hipótesis de la existencia de células troncales cancerosas ha explicado la heterogeneidad entre células cancerosas que componen un tumor, en donde solo las células troncales cancerosas tienen la capacidad de originar y mantener el crecimiento tumoral debido a su capacidad de autorenovarse y dar lugar a células diferenciadas que pueden proliferar transitoriamente, indicando la presencia de una organización jerárquica entre células componentes de un tumor (Han M. & Oh S., 2013). Las células troncales cancerosas en general son resistentes a la quimioterapia y radioterapia, esta resistencia es conferida, por ejemplo, por el incremento de

la enzima ALDH y complejos detoxificantes, bombas ABC, además de la regulación positiva de mecanismos anti-apoptóticos.

Recientemente, se han identificado y caracterizado poblaciones colaterales dentro de tumores y líneas celulares de cáncer gástrico (Fukuda K. *et al*, 2009). Dentro de los marcadores fenotípicos que han permitido identificar a las GCSC se encuentra el marcador de superficie CD44, receptor para ácido hialurónico y un biomarcador fenotípico de GCSC. En cáncer gástrico se ha establecido la presencia de CD44^{high} como un marcador de células con alta capacidad tumorigénica debido a que esta población ha mostrado capacidad de autorrenovación y de dar lugar a una progenie diferenciada, en líneas celulares, así como en muestras de pacientes (Chen W. *et al.*, 2013, Chen T. *et al*, 2012, Yong C. *et al.*, 2012). A partir de diversas líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer se ha establecido el enriquecimiento de poblaciones en CSC a partir de medios del cultivo de esferoides en medios condicionados (Ortiz E. *et al.*, 2016), esta metodología ha sido implementada ya en líneas celulares de cáncer gástrico (Takaishi S. *et al.*, 2004, Chen T. *et al.*, 2012, Yong C. *et al.*, 2012). A partir de cultivos en monocapa de la línea celular AGS obtuvimos un porcentaje promedio de 2.10% de células CD44^{high} que difiere con el 0.21% reportado en 2013 por Chen W. y colaboradores, mientras que, a partir de un cultivo en esferas, los esferoides de la línea celular AGS que obtuvimos al 7° día de cultivo muestran un incremento de la población CD44^{high} de 7.54% en comparación a su monocapa, dato que correlaciona con lo publicado por Zhang C. y colaboradores, quienes reportan un enriquecimiento de células CD44^{high} a los días 7° y 10° de entre el 4-15%.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que existe un enriquecimiento de células con características de células troncales de cáncer cervico-uterino en días de cultivo previos al 7° día de incubación (Tesis de Maestría de Pérez L.). Así, en este trabajo, a través de una cinética curso temporal evaluando el marcador CD44^{high} demostramos que hay un mayor porcentaje de GCSC enriquecidas con el marcador CD44^{high} al tercer día de

cultivo, alcanzando el 54.5% de la población analizada, porcentaje que está por encima de la expresión del marcador de superficie CD44^{high} reportado para AGS, en 2009 por Takaishi S. y colaboradores que correspondió entre el 10-50%. La línea celular NCI-N87, según Takaishi S. y colaboradores presenta un porcentaje de células CD44 menor al 5%, sin embargo, nuestro equipo de trabajo obtuvo al 3^{er} día de cultivo en esferas y enriquecido en GCSC hasta el 10% de células CD44^{high}. Es claro que entre más días de cultivo en esferas se obtiene un mayor número de células, sin embargo, la proporción GCSC disminuye, y nuestro principal interés fue obtener el mayor porcentaje de enriquecimiento de GCSC, resultado de la capacidad de esta población para autorenovarse. Como se mencionó previamente, existe un bajo porcentaje de células troncales en una monocapa, y al sembrarse en condiciones no adherentes y en un medio condicionado, son las únicas con la capacidad de autorrenovarse y formar esferas, mientras que aquellas terminalmente diferenciadas mueren a las primeras horas de cultivo. Una vez formada una esfera por mecanismos de autorenovación, las células que la conforman no son exclusivamente células troncales cancerosas, sino que existen células con diferentes grados de diferenciación. Por otra parte, al pasar los días, las esferas aumentan su tamaño y disminuye el espacio disponible que una célula tiene para autorenovarse; el agotamiento de oxígeno al interior y de los elementos que suplementan el medio condicionado para la formación de esferas pueden causar una disminución de GCSC. Diversos autores, reconstituyen (agregar medio) o realizan un cambio de medio, generalmente al 4^o día, sin embargo, debido al aumento de la población celular, reconstituir el medio puede no ser suficiente, principalmente por el cambio de pH (observado por el cambio de color del medio) promoviendo la muerte celular. Dentro de los factores que pueden suplementar un medio condicionado para la formación de GCSC, se encuentra EGF, que se considera un factor clave en el nicho de las células troncales intestinales (Gattazo F., *et al*, 2014). EGF puede mantener el estado de troncalidad, por la activación de la vía de señalización STAT3 permitiendo la expresión del factor de transcripción de

troncalidad, Nanog. Se ha reportado que Nanog y Oct4 inducen la expresión de los factores de transcripción SNAIL (Meng H. et al., 2010) y SLUG (Cermeño E. & García A., 2016) que se unen al promotor del gen CDH1 que codifica para E-cadherina, causando la disminución o pérdida de la expresión de esta proteína, que en condiciones normales se une con β -catenina para formar un complejo. Al disminuir o desaparecer E-cadherina, β -catenina se acumula, se transloca al núcleo y permite la expresión de diversas proteínas entre las que se encuentra el marcador de superficie asociado a troncalidad, CD44, por lo que, mantener un cultivo en esfera en el que los nutrientes del “serum replacement” (libre de elementos que inducen la diferenciación, por ejemplo, la vitamina A) y factores estén disponibles puede permitir un mayor enriquecimiento de la población.

Nanog y Oct4 son factores de transcripción pluripotentes que contribuyen a la reprogramación de células somáticas hacia un estado de troncalidad, debido a que trabajan como represores de la diferenciación y se ha reportado que están sobre-regulados en diversos tipos de cáncer (Liu A. et al, 2013). Zhao Z y colaboradores en 2016 reportaron que el nivel relativo de expresión de Nanog se incrementa en tejidos gástricos cancerosos, principalmente en tumores indiferenciados en comparación con tejidos adyacentes. Nanog ha sido detectado en metaplasias intestinales y displasias (etapas previas al cáncer gástrico) por lo que Zhang J. y colaboradores en 2010, sugirieron que Nanog tiene un papel importante en estadios tempranos de la carcinogénesis gástrica. Por otra parte, Jiang W. y colaboradores reportaron en 2015, que Oct4 está sobre-regulado en tejidos de cáncer gástrico en comparación a tejidos adyacentes, mostrando una correlación con la metástasis. En este estudio, a través de citometría de flujo se mostró que Nanog y Oct4 se expresan en cultivos en monocapa de las líneas células AGS y NCI-N87, nuestros resultados coinciden con el análisis del perfil de expresión de Oct4 y Nanog en la línea celular AGS por Bagrezaei F. y colaboradores en 2014. Respecto a cultivos en esferas enriquecidos en GCSC, nuestro análisis

mostró un aumento significativo de la expresión de Oct4 y Nanog respecto a monocapa. Ya que, Oct4 y Nanog son necesarios para los procesos de autorenovación, sugerimos que en los cultivos en esfera existe una población enriquecida en GCSC, que es responsable de la sobrerregulación de los factores de troncalidad Nanog y Oct4, y estos factores a su vez controlan la diferenciación y la proliferación, ambos procesos involucrados en la carcinogénesis.

El receptor tirosina cinasa c-Met es un receptor de superficie celular altamente regulado en células de origen epitelial, que promueve la remodelación de tejidos, la reparación y la activación oncogénica de c-Met, al suprimir la apoptosis y promover la proliferación, migración y la angiogénesis. En cáncer gástrico, la activación de c-Met ha sido atribuida a la amplificación genética y se ha establecido una correlación con la invasión y la metástasis a nódulos linfáticos (Nakajima M. *et al.*, 1999). Recientemente, Kawakami H. y colaboradores en 2012, mostraron que la sobre-expresión y amplificación de MET fue un indicador de pobre prognosis en pacientes con cáncer gástrico. La relación entre la activación del receptor c-Met y el estado de troncalidad fue demostrada en 2011 por Leenders G. y colaboradores al reportar que la activación de c-Met induce fenotipos troncales en cáncer de próstata al regular a CD44. Por otra parte, L. Yunqing y colaboradores en 2011 reportaron la activación y actividad funcional de c-Met en neuroesferas de glioblastoma y concluyeron que la fosforilación de c-Met indujo la expresión de Oct4 y Nanog. En este trabajo observamos que la actividad funcional del receptor c-Met en la línea celular AGS cambia a un estado fosforilado en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC, mientras que en la línea celular NCI-N87 aumenta su actividad. Se sabe que c-Met puede ser transactivado en ausencia del ligando HGF por varios miembros de receptores de semaforinas, plexinas y neurofilinas (Organ S. & Tsao M., 2011); sin embargo, sugerimos que el cambio de estado funcional del receptor en la línea celular AGS puede deberse específicamente a la estimulación de EGF (presente en el medio

condicionado para la formación de esferas) que se une al EGFR y este a su vez a c-Met, causando la fosforilación de c-Met.

Al inhibir la fosforilación del sitio catalítico del receptor c-Met fue posible establecer una asociación entre la activación de c-Met con un fenotipo troncal caracterizado por la expresión de Oct4 y Nanog. Tras la fosforilación de c-Met se reclutan diversos efectores que incluyen proteínas adaptadoras como GRB2 y la unión directa de otras proteínas como, STAT3, que permiten la activación de diversas vías de señalización entre las que se encuentran STAT3 y WNT, que dan lugar a la expresión de Nanog y del marcador CD44 respectivamente, y a través de la activación de estas vías de señalización sugerimos que c-Met podría estar relacionada con el mantenimiento del estado troncal en una pequeña población de líneas celulares de cáncer gástrico.

El potencial clonogénico indica la capacidad de autorenovación por la formación de colonias. En 2011 Que W y Chen J. determinaron que al inhibir c-Met, se disminuye la adherencia y el potencial de proliferación de células cancerosas de mieloma múltiple. Nuestros resultados muestran que las células de la línea celular AGS provenientes de un cultivo en monocapa tienen capacidad de formar colonias, coincidiendo con lo reportado por Shabelnik M y colaboradores en 2011, mientras que para la línea celular NCI-N87 a 10 días de incubación no observamos ninguna colonia, sin embargo, Seo J y colaboradores en 2014, reportaron la formación de colonias a las 3 semanas de incubación. Al comparar la capacidad clonogénica de las líneas células AGS y NCI-N87 derivadas de un cultivo en esfera y un cultivo con PHA-665752, observamos una disminución significativa del número de colonias formadas en ambos casos, sugerimos que esta diferencia puede atribuirse a que c-Met activa vías de señalización como Ras- MAPK y PI3K-AKT involucradas con la proliferación y sobrevivencia, respectivamente.

Para migrar a través de la matriz extracelular, las células cancerosas requieren de un re-arreglo en el citoesqueleto de actina que les permita

remodelar y degradar la matriz extracelular para moverse (Yamaguchi H. *et al.*, 2005). El ensayo de cierre de herida o scratch se realizó únicamente en la línea celular AGS, debido a que las células de NCI-N87 tienen un tamaño que oscila entre 15 y 20µm y forma colonias muy compactas. Algunas células de la monocapa de la línea celular AGS fueron capaces de migrar a las 24 y 48 horas, nuestro resultado coincide con lo reportado por Yang M. y colaboradores. Al realizar el ensayo de las células derivadas de un cultivo de esferas y con PHA-665752, contrario a lo que esperamos, al realizar la herida, las células no migraron en ninguno de los dos cultivos, consideramos pertinente ahora hacer el ensayo de migración en una cámara Boyden, y evaluar si las células tienen la capacidad de migrar empleando un quimioatrayente.

El termino invasión indica penetración hacia otros tejidos, lo que permite que las células cancerosas entren en circulación, lo que les permite llegar a tejidos distantes y eventualmente formar tumores secundarios. Cabe destacar que a pesar de que se ocuparon 3 tratamientos independientes, se realizó solo un ensayo. Las células de monocapa de la línea celular AGS tuvieron la capacidad de invadir, como reporta Yang M. y colaboradores; así como las células derivadas de esferas y con el inhibidor y no observamos diferencias significativas en el número de células que pasaron a través de la membrana de matrigel. Mientras que, las células de la línea celular NCI-N87 no tuvieron la capacidad de migrar, cabe mencionar que se realizó un solo ensayo y a pesar que se esperaron hasta 36 horas, no observamos invasión. Estos resultados sugieren la necesidad de realizar ensayos de “cell sorting” y realizar los ensayos de migración e invasión con un fenotipo CD44^{high} CD24^{high} CD54^{high} que constituyen marcadores fenotípicos de forma individual y simultanea (CD44^{high} CD24^{high} y CD44^{high} CD54^{high}) de GCSC para poder afirmar o descartar la capacidad de migración e invasión de la línea celular NCI-N87.

13 CONCLUSIONES

- A través de la formación de esferas en medios condicionados, se logró obtener una población enriquecida en GCSC, y al tercer día de cultivo las células CD44^{high} incrementaron hasta el 54.5% de enriquecimiento en la línea celular AGS y 10% en NCI-N87.
- El receptor c-Met en la línea celular AGS pasa de un estado inactivado a activado o fosforilado en un cultivo en esfera enriquecido en GCSC, mientras que en la línea celular NCI-N87 c-Met fosforilado aumenta.
- Existe un incremento de los factores de transcripción de troncalidad Oct4 y Nanog en los cultivos en esfera enriquecidos en GCSC comparado a la monocapa en las líneas celulares AGS y NCI-N87.
- La fosforilación del sitio catalítico del receptor c-Met permite establecer una posible asociación entre la activación de c-Met con el mantenimiento del estado troncal de GCSC caracterizado por la expresión de Oct4 y Nanog.

- La activación del receptor c-Met está relacionada con la capacidad clonogénica de células derivadas de un cultivo en esfera de las líneas celulares AGS y NCI-N87, sin embargo, no hay relación entre la activación del receptor c-Met y la capacidad de migración e invasión.

14 PERSPECTIVAS

Para poder definir la función biológica de la activación del receptor c-Met en poblaciones enriquecidas en GCSC, consideramos que es necesario.

- Estudiar los marcadores de la transición epitelio mesénquima y su relación con de c-Met.
- Identificar la expresión de los marcadores de superficie asociados a troncalidad CD44, CD24 y CD54, y su relación con c-Met.
- Analizar la actividad funcional y la asociación entre la activación de c-Met con las isoformas de Oct4 y Nanog.
- Identificar las vías de señalización involucradas en la activación de c-Met y la expresión de los factores de transcripción de troncalidad Oct4 y Nanog.

15 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Por cada 100 mil habitantes para cada grupo de edad

Tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Órganos digestivos	3.45	12.87	29.87	73.37	126.92	189.02	208.74	150.20
Órganos genitales masculinos	0.79	0.91	3.42	21.21	57.12	113.51	154.88	145.21
Órganos hematopoyéticos	15.54	12.93	17.22	21.79	29.85	35.20	39.19	36.91
Tejido linfático y afines	9.18	10.00	14.72	26.46	41.33	44.87	47.46	32.87
Órganos respiratorios e intratorácicos	1.81	2.60	5.80	21.07	39.95	76.06	101.64	78.40
Células germinales (testículo)	22.25	14.17	4.95	3.15	2.39	3.36	2.81	3.37
Mujeres								
De mama	4.56	37.75	108.48	171.13	180.71	175.88	142.30	81.25
Órganos genitales femeninos	10.76	33.39	64.42	84.97	109.76	108.36	87.30	54.89
Órganos digestivos	4.16	11.57	28.59	66.23	95.55	128.72	159.57	115.00
Células germinales (ovario)	5.14	8.93	23.54	34.11	36.34	39.55	34.42	16.35
Órganos hematopoyéticos	9.53	10.48	13.99	24.19	27.18	30.89	31.65	26.14
Tejido linfático y afines	6.69	7.90	9.93	21.46	29.01	39.43	43.65	28.85

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C15-C26, C30-C39, C50, C51-C58, C60, C61, C63, C61-C65, C68-C95, C96.

Fuente: SSA (2015). *Base de Egresos Hospitalarios 2013*; y CONAPO (2015). *Proyecciones de la Población 2010-2050*. Procesó INEGI.

Por cada 100 mil habitantes para cada sexo

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	32.52	33.98	31.20
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.58	14.71	6.83
Sistema reproductor masculino	8.44	17.75	NA
Mama ¹	7.59	0.14	14.36
Órganos genitales femeninos	6.78	NA	12.93
Órganos hematopoyéticos ²	5.68	6.28	5.14
Vías urinarias ²	4.12	5.51	2.85
Células germinales (testículo u ovario) ¹	3.48	1.30	5.46

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C15-C39, C50-C61, C63-C68, C88-C95.

¹ Para los hombres, el cáncer de mama y tumor de testículo no son una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

² Para las mujeres, el cáncer en órganos hematopoyéticos y de vías urinarias no son de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

NA No aplicable.

Fuente: INEGI (2015). *Estadísticas de Mortalidad*. Cubos dinámicos; y CONAPO (2015). *Proyecciones de la Población 2010-2050*. Proceso INEGI.

16 BIBLIOGRAFÍA

Alves C, Rosivatz E, Schott C, Hollweck R, Becker I, Sarbia M, Carneiro F, Becher K. (2007). "Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin". *J Pathol*. 211: 507-515.

Bagrezaei F, Mahmoodi M, Reza Hajizadeh M, Akbarpoor V, Bahramabadi R, Reza Mirzaei M. (2016). Curcumin effect on the expressional profile of oct4, nanog and nucleostemin genes in AGS (adenocarcinoma) cancer cell line. *Zehedan J Res Med Sci*. 18(7).

Biteau B., Hochmuth C., Jasper H. (2011). "Maintaining Tissue Homeostasis: Dynamic Control of Somatic Stem Cell Activity". *Cell Stem Cell*. 9: 402-411.

Brungs D, Aghmesheh M, Vine KL, Becker TM, Carolan MG, Ranson M. (2016). *J. Gastroenterol*. 51(4): 313-326.

Cano A, Pérez-Moreno M, Rodrigo I, Locascio A, Blanco M, del Barrio M, Portillo F, Nieto A. (2000). "The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*. 2: 76-83.

Cermeño E. & García A. (2016). "Tumor initiating cells: emerging biophysical methods of isolation. *Curr Stem Cell Rep*. 2: 21-32.

Chan A. (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 12(2): 199-203.

- Chen S**, Hou J, Feng X, Zhang X, Zhou Z, Yun J, Chen Y, Cai M. (2013). "Clinicopathologic significance of putative stem cell marker CD44 and CD133, in human gastric carcinoma". *Journal of Surgical Oncology*. 107: 799-806.
- Chen T**, Yang K, Yu J, Meng W, Yuan D, Bi F, Liu F, Liu J, Dai B, Chen X, Wang F, Zeng F, Xu H, Hu J, Mo X. (2012). Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients. *Cell Research*. 22: 248-258.
- Chen W**, Zhang X, Chu C, Cheung WL, Ng L, Lam S, Chow A, Lau T, Chen M, Li Y, Nie Y, Wong BC, Pang R. (2013). "Identification of CD44+ cancer stem cell in human gastric cancer". 124: 949-954.
- De Weber O**, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G (2008). "Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front". *Histochem Cell Biol* 130: 481-494.
- Eder JP**, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. (2009). "Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer". *Clin Cancer Res*. 7: 2207-2214.
- Elliot V**, Rychahou P, Zaytseva Y, Evers B. (2014). "Activation of c-Met and Upregulation of CD44 expression are associated with the metastatic phenotype in the colorectal cancer liver metastasis model". *Plos One*. 9:
- Fujikuni N**, Yamamoto H, Tanabe K, Naito Y, Sakamoto N, Tanaka Y, Yanagihara K, Oue N, Yasui W, Ohdan H. (2014). "Hypoxia-mediated CD24 expression is correlated with gastric cancer aggressiveness by promoting cell migration and invasion". *Cancer Sci*: 105: 1411-1420.
- Fukuda K**, Saikawa Y, Ohashi M, Kumaai K, Kitajima m, Okano H, Matsuzaki Y, Kitagawa Y. (2009). "Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer". *Int J. Oncology*. 34 (5): 1201-1207.
- Fuyuhiro Y**, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, Kato Y, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K. (2010). Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells". *Anticancer Research*. 30: 5239-5244.
- Gatazzo F**, Urciuolo A, Bonaldo P. (2014). "Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche". *Biochim Biophys Acta*. 8:2506-2519.
- Gentry S.** & Jackson T. (2013). A mathematical model of cancer stem cell driven tumor initiation: implications of niche size and loss of homeostatic regulatory mechanisms. *Plos one*. 8: 1-15.
- Giannakis M**, Stappenbeck T, Mills J, Leip D, Lovett M, Clifton S, Ippolito J, Glasscock J, Arumugam M, Brent M, Gordon J. (2005). "Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches". *Journal of Biological Chemistry*. 281: 11292-11300.
- Guo T**, Zhu Y, Gan C, Lee S, Zhu J, Wang H, Li X, Christensen J, Huang S, Kon O, Sze S. (2010). "Quantitative proteomics discloses MET expression in mitochondria as a direct target of MET kinase inhibitor in cancer cells". *Mol Cell Proteomics*. 12: 2629-2641.
- Ha S**, Lee J, Yang S, Do I, Ahn S, Park J, Kang W, Choi M, Sohn T, Bae J, Kim S, Kim M, Kim S, Park C, Ignatius S, Kim K. (2013). "MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas". *Nature Modern Pathology*. 26: 1632-1641.
- Han M.** & Oh S. (2013). "Gastric stem cells and gastric cancer stem cells". *Anat. Cell Biol*. 46: 8-18.
- Hanahan D.** & Weinberg R. (2011). "Hallmarks of Cancer: The next generation". *Cell*. 144: 646-674.
- Hazan R**, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. (2004). "Cadherin switch in tumor progression". *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1014: 155-163.
- Heindl S**, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, Rauser S, Gasteiger

- G, Drexler I, Hapfelmeier A, Höfler H, Lubber B. (2012). "Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines". *J Cancer Res Clin Oncol*. 5: 843-858.
- Horiguchi K**, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. (2009). "Role of Ras Signaling in the induction of Snail by Transforming Growth Factor- β ". *Journal of Biological Chemistry*. 284: 245-253.
- Huang S**. (2007). Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Molecular pathways*. 13 (5).
- Jiang W**, Zhang P, Li G, Dong J, Wang X, Wang Y. (2016). "Oct-4 is associated with gastric cancer progression and prognosis". *Oncotargets Ther*. 9: 517-522.
- Kamikihara T**, Ishigami S, Arigami T, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Kijima Y, Ueno S, Natsugoe S. (2011). "Clinical implication of N-cadherin expression in gastric cancer". *Pathology international*. 62: 161-166.
- Kawakami H**, Okamoto I, Arai T, Okamoto W, Matsumoto K, Taniguchi H, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K, Yamada Y. (2013). "MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer". *Oncotarget*. 4(1): 9-17.
- Kazumasa F**, Saikawa Y, Ohashi M, Kumagai K, Kitajima M, Okano H, Matsuzaki Y, Kitagawa Y. (2009). "Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer". *International Journal of Oncology*. 34: 1201-1207.
- Kim T**. & Shivdasani R. (2011). Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*. 4: 677-688.
- Komiya Y**, Habas R. (2008). "Wnt signal transduction pathways". *Organogenesis*. 4(2): 68-75.
- Kreso A**, Dick J. (2014). "Evolution of Cancer Stem Cell Model". *Cell Press*. 14: 279-291.
- Lai AZ**, Abella JV, Park M. (2009). "Crosstalk in Met receptor oncogenesis". *Trends Cell Biol*. 10: 542-551.
- Lamouille S**, Xu J, Derynck R. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition". *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:178-196.
- Leenders G**, Sookhlall R, Teubel W, de Ridder C, Reneman S, Sacchetti A, Vissers K, Weeden W, Jenster G. (2011). "Activation of c-Met induces a stem-like phenotype in human prostate cancer". *Plos One*. 6(11).
- Li K**, Dan Z, Nie Y. (2014). "Gastric cancer stem cells in gastric carcinogenesis, progression, prevention and treatment". *World Journal of Gastroenterology*. 20(18) 5420-5426.
- Liu A**, Yu X, Liu S. (2013). "Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference". *Chinese Journal of Cancer*. 32(9): 483-487.
- Liu X**. & Chu K. (2014). E-Cadherin and Gastric cancer: Cause, consequence and applications. *BioMed Research international*. 2014:
- Mao J**, Fan S, Ma W, Fan P, Wang B, Zhang J, Wang H, Tang B, Zhang Q, Xu X, Wang L, Song B, Li L. (2014). "Roles of Wnt/ β -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment". *Cell Death and Disease*. 5, e1039.
- Marano L**, Chiari R, Fabozzi A, De Vita F, Boccardi V, Roviello G, Petrioli R, Marrelli D, Roviello F, Patria A. (2015). "c-Met targeting in advanced gastric cancer, An open challenge". *Cancer letters*.
- McLean M**. & El-Omar E. (2014). "Genetics of gastric cancer". *Nature*. 11: 6664-674.
- Meng H**, Zheng P, Wang X, Liu C, Sui H, Wu S, Zhou J, Ding Y, Li J. (2010). "Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in

colorectal cancer". *Cancer Biology & Therapy*. 9:4, 295-302.

Moulik S, Pal S, Biswas J, Chatterjee A. (2014). "Role of ERK in modulating MMP2 and MMP9 with respect to tumour invasiveness in human cancer cell line MCF-7 and MDA-MB-231". *J of tumor*. 2.

Murai T, Yamada S, Fuchs B, Fujii T, Nakayama G, Sugimoro H, Koike M, Fujiwara M, Tanabe K, Kodera Y. (2014). "Epithelial to mesenchymal transition predicts prognosis in clinical gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 109: 684-689.

Nagini S. (2012). "Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention". *World J. Gastrointest Oncol*. 4(7): 156-169.

Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. (1999). "The prognostic significance of amplification and overexpression of c-Met and c-Erb B-2 in human gastric carcinomas". *Cancer*. 85(9): 1894-1902.

Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martínez-Orozco R, Salazar EP. (2010). "Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway". 2: 306-317.

Nishikawa S, Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Kano Y, Ohta K, Fukusumi T, Saki D, Kudo T, Haraguchi N, Satoh T, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Ishii H. (2013). Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy". *Int J Oncology*. 42(4): 1437-1442.

Okamoto W, Okamoto I, Arao T, Yanagihara K, Nishio K, Nakagawa K. (2011). Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *British Journal of Cancer*. 105(3) 407-412

Organ S. & Tsao M. (2011). "An overview of the c-MET signaling pathway". *Therapeutic Advances in Medical Oncology*.

Ortiz E, Santiago L, Cruz V, Toledo, M, Hernandez D, Muñoz S, Garrido E, Cantú D, Garcia A. (2016). "Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*.

Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, Ishikawa T, Takagi Y, Kato K, Yamada H, Kojima K, Sugihara K. (2010). "Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer". *Oncology reports*. 25: 1235-1242.

Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, Carvalho J, Ribeiro A, Caldeira J, Costa A, Simoes-Correia J, Oliveira M, Pinheiro H, Pinho S, Mateus R, Reis C, Leite M, Fernandez M, Schmitt F, Carneiro F, Figueiredo C, Oliveira C, Seruca R. (2012). "Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1826: 297-311.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. (2003). "Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene". *Cancer Cell*. 3(4): 347-361.

Peng Z, Wang C, Fang E, Wang G, Tong Q. (2014). "Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression". *World J Gastroenterol*. 20(18):5403-5410.

Pérez L. (2016). Participación de la vía de notch en el mantenimiento de las células troncales cancerosas de la línea celular HeLa.

Que W. & Chen J. (2011). Knockdown of c-Met inhibits cell proliferation and invasion and increases chemosensitivity to doxorubicin in human multiple myeloma U226 cell in vitro. *Mol Med Rep*. 4(2): 33-349.

Raya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001). "Stem cells, cancer and cancer stem cells". *Nature*. 1; 414: 105-11.

Reymond N, Borda d'Água B, Ridley A. "Crossing the endothelial barrier during metastasis". *Nature*. 13: 858-870.

- Saraiva-Pava K**, Navabi N, Skoog E, Linden S, Oleastro M, Roxo-Rosa M. (2015). "New NCI-N87 derived human gastric epithelial line after human telomerase catalytic subunit over-expression". *World J Gastroenterol.* 21: 6526-6542.
- Schroeder A**, Heller D, Winslow M, Dahlman J, Pratt G, Langer R, Jacks T, Anderson D. (2012). "Treating metastatic cancer with nanotechnology". 12: 39-50.
- Seo J**, Jeong E, Choi Y. (2014). "Therapeutic effects of lentivirus-mediated shRNA targeting of cyclin D1 in human gastric cancer". *BMC cancer.*
- Shabelnik MY**, Kovalevska LM, Yurchenko MY, Shlappatska LM, Rzepetsky Y, Sidorenki SP. (2011). "Differential expression of PKD1 and PKD2 in gastric cancer and analysis of PKD1 and PKD2 function in model system". *Exp Oncol.* 33(4): 206-211.
- Singh S**. (2013). Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target. *Cancer Lett.* 1: 110-119.
- Tai MH**, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. (2005). "Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis". *Carcinogenesis.* 26: 495-502.
- Takaishi S.**, Okumura T., Tu S., Wang S., Shibata W., Vigneshwatan R., Gordon S., Shimada Y., Wang T. (2009). "Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44". *Stem Cells.* 27 (5): 1006-1020.
- Uccelli A**, Moretta L, Pistoia V. (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease". *Nat Rev Immunol.* (9): 726-736.
- Vries R**, Huch M, Clevers H. (2010). "Stem cells and cancer of the stomach and intestine". *Molecular Oncology.* 4: 373-384.
- Wakamatsu Y**, Sakamoto N, Oo H, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W. (2012). "Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer" *Pathology international.* 62: 112-119.
- Wang X**, Zhu Y, Ma Y, Wang J, Zhang F, Xia Q, Fu D. (2012). "The role of cancer stem cells in cancer metastasis: New perspective and progress". *Cancer epidemiology.* 37:60-63.
- Wee A**, Kang J, Teh M. (1992). "Helicobacter pylori and gastric cancer: correlation with gastritis, intestinal metaplasia, and tumour histology". *Gut.* 33(8): 1029-1032.
- Wendt M**, Balanis N., Carlin C., Schiemann W. (2014). STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAK-STAT.* 3(2).
- Wheelock MJ**, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. (2008). "Cadherin switching". *J. Cell Sci.* 121: 727-735.
- White A.** & Lowry W. (2015). Redefining the role for adult stem cells as cancer cells of origin. *Cell.* 25: 11-20.
- Yamaguchi H**, Wyckoff J, Condeelis J. (2005). "Cell migration in tumors". *Curr Opin Cell Biol.* 17(5): 559-564.
- Yang L**, Ping Y, Yu Xi, Quian F, Guo Z, Qian C, Cui Y, Bian X. (2011). "Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype". *Cancer Letters.* 310: 46-52.
- Yang M**,
- Yang Z**, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, Han J, Lou T, Wen F, Wu X. (2007). "Up-regulation of gastric cancer cell invasion by twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression". *Biochem Biophys Res Commun.* 3: 925-930.
- Yashiro M**, Nishii T, Hasegawa T, Matsuzaki T, Morisaki T, Fukuoka T, Hirakawa K. (2013). "A c-Met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma". *British Journal of Cancer.* 109: 2619-2628.

- Yilmaz M.** & Christofori G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis*. 28(1-2): 15-33.
- Yong C,** Yang C, Chou Y, Liao C, Lee C, Lee C. (2012). "CD44/CD24 expression in recurrent gastric cancer: a retrospective analysis". *BMC Gastroenterology*.
- Yunqing L,** Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, Xia S, Trageser D, Guerrero-Cázares H, Eberhart C, Quiñones-Hinojosa A, Scheffler B, Lathera J. (2011). "c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype". *Proc Natl Acad Sci*. 108(24): 9951-9956.
- Zhang C.** Li C, He F, Cai Y, Yang H. (2011). "Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells". *J Cancer Res Clin Oncol*. 11: 1679-1686.
- Zhao L,** Li W, Zang W, Liu Z, Xu X, Yu H, Yang Q, Jia J. (2013). "JMJD2B promotes epithelial-mesenchymal transition by cooperating with β -catenin and enhances gastric cancer metastasis". *Clin Cancer Res*. 19: 6419-642.
- Zhan J,** Wang X, Chen B, Xiao Z, Li W, Lu Y, Dai J. (2010). "The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development". *Oncology Letters*. 1(3): 457-463.
- Zhao X,** Sun B, Sun D, Liu T, Che N, Dong X, Li R, Liu Y, Li J. (2015). "Slug promotes hepatocellular cancer cell progression by increasing Sox2 and Nanog expression". *Oncol Report*. 33(1): 149-56.
- Zhao X,** Wang F, Hou M. (2016). "Expression of stem cell markers nanog and PSCA in gastric cancer and its significance". *Oncology Letters*. 11(1): 442-448.
- Zheisberg M.** & Neilson E. (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions". *The Journal of Clinical Investigation*. 119: 1429-1437.
- Zhen H,** Takahasi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. (2006). Expressions of MMP-2, MMP9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Research*. 26:3579-3584.