



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Células Troncales Cancerosas: Factores de Transcripción  
asociados a tumorigenicidad y terapia con Resveratrol**

Tesis que presenta

**M. en C. GRACIELA RUIZ RAMIREZ**

para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE

**Genética y Biología Molecular**

Directores de la Tesis: Dr. Patricio Gariglio Vidal  
Dr. Alejandro García Carrancá

Ciudad de México

Diciembre, 2017

Para mi madre

Gracias Horacio!

## **AGRADECIMIENTOS A CONACYT**

Durante el período en que cursó del doctorado en Genética y Biología Molecular, la M. en C. Graciela Ruiz Ramírez recibió beca del CONACYT.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer-UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología, México D.F. y en el Laboratorio del Dr. Patricio Gariglio en el Departamento de Genética y Biología Molecular (DGBM).

Bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio Vidal

La codirección del Dr. Alejandro García Carrancá

## **Agradecimientos académicos**

Agradezco los comentarios y asesoría académica de mi comité tutorial:

Dr. Rosa Ma. del Refugio Bermúdez Cruz. Investigador CINVESTAV

Dr. Jaime García Mena. Investigador CINVESTAV

Dr. Luis Kameyama Kawabe. Investigador CINVESTAV

Dr. José De La Luz Díaz Chávez Investigador en ciencias médicas INCAN

Agradezco profundamente la colaboración y asesoría académica del M. en C.  
Heriberto Abraham Valencia González

## INDICE

<b>1. Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Células troncales .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Células troncales y Cáncer.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Autorrenovación, pluripotencia y troncalidad de las CTC. ....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 El cáncer cervicouterino .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Papel de OSNKM en la tumorigenicidad .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Radio-resistencia y quimio-resistencia de células troncales cancerosas....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Resveratrol .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Células Troncales Cancerosas: Factores De Transcripción asociados a tumorigenicidad: Los factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc se expresan en cáncer cervicouterino e inducen tumorigenicidad en una línea celular no tumorigénica.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1.1. Biopsias derivadas de CaCU sobreexpresan los factores de pluripotencia y troncalidad OSNKM.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1.2. Los factores OSNKM están presentes en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas de CaCU e induce la formación de esferas en HaCaT.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.3. Los factores OSNKM inducen un fenotipo tumoral en HaCaT.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.4. Oct4 y Sox2 en biopsias de tumores de CaCU muestran asociación con la histopatología o la respuesta clínica.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.1. La población enriquecida en células troncales cancerosas responde pobremente al tratamiento con Etopósido (VP16). ....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2. Las Células troncales cancerosas sobreexpresan RAD51 y disminuyen su viabilidad cuando se inhibe RAD51. ....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.3. El silenciamiento de RAD51 favorece la muerte celular de HeLa Esferas tratadas con VP16.....</b>	<b>31</b>

<b>4.2.4. La población enriquecida en células troncales cancerosas responde al tratamiento con Resveratrol y disminuye selectivamente la población CD49f..</b>	<b>33</b>
<b>4.2.5. El tratamiento con el Resveratrol disminuye los niveles de la proteína RAD51 y potencia el efecto antineoplásico del etoposido.</b>	<b>35</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>37</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>40</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>41</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>42</b>
<b>9. Apéndices</b>	<b>47</b>
<b>9.1 Detalle de procedimientos experimentales</b>	<b>47</b>
<b>9.2 Figuras suplementarias</b>	<b>52</b>

## 1. Resumen

**Antecedentes.** El Cáncer es una enfermedad frecuente en todo el mundo. Por lo general, los pacientes son tratados con radiación y quimioterapia; sin embargo, se presenta recurrencia en un gran porcentaje de casos, incluyendo el desarrollo de metástasis y la quimio-resistencia. La existencia en los tumores de una subpoblación de células llamadas células iniciadoras del cáncer o células troncales cancerosas (CTC), puede explicar en parte la recurrencia del tumor y la progresión de la enfermedad. La autorrenovación y pluripotencia de estas células son atribuidas, principalmente, a los genes Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc (OSNKM). La expresión exógena de estos genes constituye el pilar de la medicina regenerativa al inducir un fenotipo troncal y pluripotente en fibroblastos adultos. Sin embargo, también podrían contribuir al fenotipo tumoral. Por otro lado, un trabajo previo caracterizó una subpoblación de CTC derivadas de Cáncer Cervico-uterino (CaCU) y se encontró que componentes de la maquinaria de reparación de ADN se encontraban sobreexpresados, incluyendo RAD51, por lo que podría ser un mecanismo de reparación de daño el responsable de la evasión de la muerte de estas células. Interesantemente, se ha observado que el Resveratrol, un compuesto natural, inhibe la expresión de genes de reparación del ADN, incluyendo RAD51, en células tumorales de Cáncer de mama.

**Objetivo.** Estudiar el papel que la expresión de factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc tiene sobre la tumorigenicidad en Cáncer Cervicoterino y evaluar el efecto que la inhibición de RAD51 tiene sobre la sensibilización de células troncales cancerosas.

**Material y métodos.** Se analizó los niveles de las proteínas OSNKM en muestras de CaCU por Western Blot. Se evaluó el perfil de expresión de estos genes por PCR en Tiempo Real en cultivos de esferas y monocapa de las líneas celulares HeLa y SiHa, derivadas de CaCU y en células HaCaT que son queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos. Los genes OSNKM fueron transducidos en HaCaT y se evaluó si adquirieron fenotipo de troncalidad o capacidad tumorigénica *in vitro* e *in vivo*. Finalmente se evaluó, mediante inmunohistoquímica, la presencia de las proteínas de Oct4, Sox2, P16 y algunos genes asociados a ellos, en biopsias de CaCU de quienes se conoce la respuesta clínica al tratamiento oncológico. Para la segunda parte se utilizaron esferas enriquecidas en CTC que fueron tratadas con Resveratrol y con siRNAs contra RAD51, se evaluó la viabilidad células mediante MTT y apoptosis, así como el silenciamiento de RAD51 mediante Wester Blot.

**Resultados.** Los genes OSNKM tienen participación en la inducción de un fenotipo troncal y tumoral en CaCU. Se observó un aumento en la tasa de apoptosis de las CTC cuando fueron tratadas con Resveratrol y siRNAs contra RAD51.

**Conclusión.** Los factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc se encuentran sobreexpresados en muestras de CaCU en cultivos enriquecidos en células troncales de las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de cáncer cervicouterino, inducen la tumorigenicidad en la línea celular HaCaT. Además, se ha demostrado que la inhibición de RAD51 es crítica para la quimiosensibilización de células troncales cancerosas obtenidas de HeLa.

**Palabras clave:** Cáncer cervicouterino, Células troncales cancerosas, Factores de pluripotencia y troncalidad, Tumorigenicidad, RAD51, Resveratrol.



## Abstract

**Background.** Cancer is a common disease around world. In general, patients are treated with radiation and chemotherapy; however, recurrence occurs in a high percentage of cases, including metastasis and chemo-resistance. The existence of a subpopulation of cells in tumors, called cancer-initiating cells or cancer stem cells (CTC) may partly explain the tumor recurrence and progression of disease. The self-renewal and pluripotency of these cells are mainly attributed to genes Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 and c-Myc (OSNKM). The exogenous expression of these genes constitutes the mainstay of regenerative medicine by inducing a stem and pluripotent phenotype in adult fibroblasts. However, they could also contribute to tumor phenotype. On the other hand, previously it has been characterized a subpopulation of CTC derived from Cervical Cancer and these cells over-expressed genes of the DNA repair machinery, including RAD51, so it could be a damage repair mechanism responsible for evasion of the death of these cells. Interestingly, it has been observed that Resveratrol, a natural compound, inhibits the expression of DNA repair genes, including RAD51, in breast cancer tumor cells.

**Objective.** To study the role of pluripotency and stem factors Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 and c-Myc at tumorigenicity in Cervical Cancer and to evaluate the effect of the inhibition of RAD51 using Resveratrol (RES) and siRNAs over stem cell derived from CaCU.

**Materials and methods.** The expression of OSNKM proteins in CaCU samples was analyzed by Real-time PCR. The expression profile of these genes was evaluated in spheres and monolayer cultures of the HeLa and SiHa cell lines, derived from CaCU and in HaCaT cells that are immortalized non-tumorigenic keratinocytes. The OSNKM genes were transduced in HaCaT and it was evaluated if these cells acquired stem phenotype or tumorigenic capacity in vitro and in vivo. Finally, the presence of the proteins including Oct4, Sox2, Nanog was evaluated by immunohistochemistry in biopsies of patients with CaCU from whom the clinical response to oncological treatment is known. For the second part, in spheres enriched in CTC that were treated with Resveratrol and with siRNAs against RAD51 we analyzed the cell viability and apoptosis, as well as the silencing of RAD51 by Western Blot.

**Results.** The OSNKM genes have participation in the induction of a stem and tumor phenotype in cervical cancer. An increase in the rate of apoptosis of CTC was observed when were treated with Resveratrol and siRNAs against RAD51.

**Conclusion.** The pluripotency and stem factors Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 and c-Myc are expressed in cervical cancer and cultures enriched in stem cells from HeLa and SiHa cervical cell lines. these stem factors also induce tumorigenicity in the line HaCaT cell line. In addition, we observed that the inhibition of RAD51 induce chemosensitization of cancer stem cells obtained from HeLa.

**Key words:** Cervical cancer, Cancer stem cells, Pluripotency and stem cell factors, Tumorigenicity, RAD51, Resveratrol.

## **2. Introducción**

### **2.1 Células troncales**

Las células troncales (CT) son un tipo celular capaz de autorrenovarse, con un potencial de diferenciación y control homeostático. En este sentido, autorrenovación se refiere a la habilidad para formar nuevas células troncales idénticas, con el potencial de proliferación y diferenciación, de este modo se conserva la poza de células troncales. Esto resulta de una división asimétrica en la cual se produce una copia exacta con potencial de desarrollo idéntico a la progenitora. El potencial de diferenciación hace referencia a su capacidad para dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente se diversificarán y especializarán de acuerdo a procesos jerárquicos, reponiendo constantemente los tejidos de vida corta con elementos maduros. Inicialmente mantienen muchas características de sus progenitoras, pero subsecuentemente pierden el potencial de autorrenovación en cada división posterior hasta que dan origen a células maduras, diferenciadas o altamente especializadas. Finalmente el control homeostático, permite a las CT modular y balancear la diferenciación y la autorrenovación de acuerdo con la estimulación del medio ambiente y las limitaciones genéticas (Dalerba et al., 2007; Bianco et al., 2001; Donovan et al., 2001).

### **2.2 Células troncales y Cáncer**

En las últimas décadas se ha involucrado la participación de las células troncales (CT) en la génesis del cáncer. La Asociación Americana de Investigación en Cáncer definió en el año 2006 a una célula troncal cancerosa como aquella célula tumoral con la capacidad de auto-renovarse y generar los diferentes “linajes celulares” aberrantes que componen un tumor (Clarke et al., 2006). Actualmente, en el estudio del cáncer se acepta un modelo denominado “Modelo Jerárquico”, el cual está basado en la existencia de una subpoblación celular con características de CT en los tumores y que, generalmente, se encuentra en una proporción inferior al 1%. Esta subpoblación celular se distingue por su capacidad exclusiva para auto-renovarse, mantener el fenotipo maligno, generar tumores y metástasis por lo que se denomina a esta subpoblación celular como células troncales cancerosas (CTC) o células iniciadoras de cáncer (Dalerba, Cho & Clarke, 2007). Se ha propuesto que las CTC

persisten en los tumores como una población distinta y son la causa de la metástasis y/o recurrencia en cáncer, pues son las responsables de generar nuevos tumores (Al-Hajj et al. 2003). Además, se propone que las CTC desempeñan un papel central en la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, siendo responsables de la recurrencia del cáncer después de los tratamientos, aun cuando la mayoría de las células cancerosas son eliminadas (Ishii H et al., 2008).

La identificación, aislamiento y conceptualización de las células troncales cancerosas inició con el estudio de la leucemia mieloide aguda, mediante trasplantes en ratones SCID (Lapidot et al., 1994) con lo que se puso en evidencia la existencia de una población con capacidad para auto-renovarse y diferenciarse *in vivo* (Bonnet & Dick, 1997), mediante el empleo de antígenos de superficie que las caracterizan. Desde entonces, diferentes poblaciones de células troncales cancerosas han sido identificadas en múltiples tumores sólidos, tales como mama (Al-Hajj et al. 2003), cerebro (Singh et al., 2004), próstata (Collins et al., 2005), colon (Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007) cuello y cabeza (Prince et al., 2007), páncreas (Hermann et al., 2007) (Li et al., 2007), hígado (Yang et al., 2008) y melanoma (Schatten et al., 2008).

### **2.3 Autorrenovación, pluripotencia y troncalidad de las CTC.**

La existencia de CTC sugiere que algunas CT normales sufren mutaciones que derivarían en su transformación. Las CTC tienen desregulado el control homeostático sobre la generación de más CTC, así como células cancerosas con fenotipos diferentes con un potencial heterogéneo de tumorigenicidad (Al-Hajj M, 2003). Este nuevo concepto está cambiando nuestra comprensión sobre el desarrollo y progresión de los tumores. Recientemente, se ha propuesto que las CTC tendrían un papel importante en la tumorigénesis, ya que estas son generadas por diferentes mecanismos a partir de células troncales o progenitoras tempranas, y para seguir proliferando requieren autorrenovarse, por lo que es muy importante el estudio de los genes que estarían regulando este proceso en la carcinogénesis.

Algunos antecedentes apoyan la hipótesis de que los factores Oct4, Sox2, Nanog, KLF4, y c-Myc (OSNKM, por sus iniciales) están involucrados en la tumorigenicidad de CT de cáncer cervicouterino. Ye y cols. (Ye F, 2008) examinaron la expresión de Nanog en lesiones y carcinomas epiteliales cervico-uterinos y observaron asociación entre los niveles de expresión de Nanog y el grado de lesión, siendo significativamente mayores los niveles de expresión proteica en carcinomas de células escamosas comparado con lesiones intraepiteliales y, a su vez, con tejido epitelial normal. Estos resultados sugieren que Nanog podría estar implicado en la carcinogénesis del CaCu. Se ha examinado la expresión de Sox2 en tejidos del cuello uterino normales y tumorales y comparado su expresión en agregados celulares no adherentes o tumoresferas y las correspondientes células diferenciadas. Los resultados sugieren que Sox2 podría contribuir a la tumorigénesis del cervix (Ji et al., 2010).

### **2.3 El cáncer cervicouterino**

El cáncer cervico-uterino (CaCU) continúa siendo un gran problema de salud pública en el mundo, ya que ocasiona la muerte de cerca de 250,000 mujeres cada año (Ferlay, 2008). En especial, para México, representa la pérdida de más de 4,200 mujeres cada año a causa de esta enfermedad. A nivel mundial se reporta que de los pacientes diagnosticados con CaCU presentan recurrencia, siendo en el 90% de los casos en menos de 3 años posteriores al tratamiento inicial (Pectasides et al., 2008; Bosch, 1995). Por lo anterior, es imprescindible el poder mejorar la terapia de este padecimiento. Actualmente, se considera que las células troncales cancerosas podrían ser las responsables de la resistencia a la quimioterapia en CaCu.

En el CaCu y líneas celulares derivadas de este tipo de cáncer, se ha mostrado la existencia de CTC. Recientemente, se logró aislar una población enriquecida en CTC, a partir de líneas celulares establecidas de carcinomas escamosos y adenocarcinomas de CaCu (López et al., 2012). En ese trabajo, la formación de agregados celulares no adherentes o esferas, positivos para el antígeno de superficie CD49f y se demostró que dichas poblaciones sobre-expresan marcadores de células troncales epiteliales. De igual manera, se observó la sobre-

expresión de genes involucrados en la reparación de daño al ADN, evidenciando mayor radio-resistencia de las poblaciones celulares enriquecidas con CTC. Recientemente en nuestro laboratorio se reportó un fenotipo específico para las CTC derivadas de CaCU que incluye la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog, así como CD49f y Anexina II (Ortiz-Sánchez et al., 2017).

#### **2.4 Papel de OSNKM en la tumorigenicidad**

Entre los principales responsables de conferir la capacidad de autorrenovación y pluripotencia a las CTC se encuentran los genes OSNKM. La expresión exógena de estos genes resulta en la inducción de un fenotipo troncal y pluripotente en fibroblastos adultos cuando se expresan de forma combinada (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Además se ha reportado que forman una red de regulación autóloga, involucrada en el proceso de autorrenovación celular en CT normales (Chen & Daley, 2008). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que estos genes también tienen un papel fundamental en la patogénesis del cáncer cervical, tales como KLF4 (Yang & Zheng, 2012), Sox2 (Ji & Zheng, 2010), CD49f (López et al., 2012), ALDH1 (Wang et al., 2013) así como Nanog (Ye et al., 2008), además de que algunos de ellos se han encontrado expresados diferencialmente en lesiones y carcinomas epiteliales de tejido cervico-uterino.

#### **2.5 Radio-resistencia y quimio-resistencia de células troncales cancerosas**

La radioterapia y quimioterapia son los tratamientos más comunes del CaCu, contribuyendo con el 50% del tratamiento. En el caso de la radioterapia, la Radiación Ionizante (IR) provoca rupturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) en el ADN e induce muerte celular. La eficiencia en los sistemas de reparación de DSB en las células tumorales genera radio-resistencia, como se ha observado en cáncer de mama (Phillips et al., 2006) por lo que se propone que inhibir vías de reparación del ADN puede ser una buena estrategia para sensibilizar a las células cancerosas a IR.

Se ha formulado la hipótesis de que CTC persisten en los tumores como una población distinta, causando la recurrencia y dando lugar a la metástasis, que finalmente son lo que llevan a la muerte a las pacientes. Una pequeña población de células de los tumores, las células troncales cancerosas, desempeñan un papel central en la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia mostrándose como las responsables de la recurrencia del cáncer después de los tratamientos, aun cuando la mayoría de las células cancerosas parecen estar eliminadas (Ishii et al., 2008). Por ejemplo, se ha reportado en una subpoblación de cáncer de mama con un fenotipo CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup>. Cultivos en esferas derivadas de Cáncer de mama con estas características fueron irradiadas y mostraron mayor radio-resistencia, con una fracción de supervivencia del 20% (Phillips et al., 2006). En 2006 se mostró que las CTC de glioma también promueven radio-resistencia por la activación preferencial de la respuesta al daño de doble cadena del ADN (Bao et al., 2006) por reparación homóloga.

Por otro lado, la quimioterapia es uno de los métodos más usados para el tratamiento del cáncer y, la quimio-resistencia de las células cancerosas continúa siendo uno de los mayores obstáculos para el tratamiento exitoso del cáncer. La resistencia a fármacos puede surgir dentro de las células tumorales debido a los cambios genéticos que causan, por ejemplo, aumento del flujo de fármacos (resistencia intrínseca), o como resultado de la protección del microambiente de las células tumorales frente al tratamiento (resistencia extrínseca). El micro-entorno del tumor puede promover la resistencia a los medicamentos de una manera pasiva, mediante la prevención de la penetración de los fármacos al tumor, o de forma activa por secreción de citoquinas protectoras o cambiando la transcripción de genes específicos dentro de las células tumorales para anular los efectos de los fármacos (Maugeri et al., 2011; Soberón et al., 1993).

## **2.6 Resveratrol**

El Resveratrol (RES) es un polifenol natural presente en más de 72 especies de plantas, incluyendo frutas y vegetales como las uvas (Frémont et al., 2000; Sobolev & Cole, 1999). Existe evidencia de que el consumo de vino disminuye el riesgo de padecer cáncer y que el RES presente en el vino pudiera contribuir a tales efectos (Bianchini & Vainio, 2003) pues tiene propiedades anti-tumorigénicas (Tseng et al., 2004).

Varios estudios han mostrado que RES inhibe el crecimiento de diferentes líneas celulares humanas derivadas de carcinoma escamoso oral (Elattar & Virji, 1999), de ovario (Opipari et al., 2004) y próstata (Stervbo, Vang, & Bonnesen, 2006). Este efecto ha sido asociado con la habilidad del RES de detener la progresión del ciclo celular (Wolter et al., 2001), promover la diferenciación celular (Wolter et al., 2002) e inducir apoptosis (Park et al., 2001). Así mismo, RES ha sido asociado a la inhibición de la expresión de genes relacionados con la reparación de daño en el ADN, como RAD51, en la línea celular MCF-7 derivada de cáncer de mama (Leon-Galicia et al., 2012).

Por lo que en este proyecto estudiamos por primera vez la inhibición de RAD51 por RES en CTC.

### **3. Objetivos**

- Estudiar la expresión de factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc en CaCu y su efecto sobre la tumorigenicidad en una línea celular no tumorigénica y la generación del CaCu.
- Evaluar el efecto si el tratamiento con Resveratrol (RES) o siRNAs contra RAD51 inducen sensibilización al tratamiento con Etopósido (VP-16) de CTC, utilizando un modelo desarrollado de esferas enriquecidas en CTC.



## **4. Resultados**

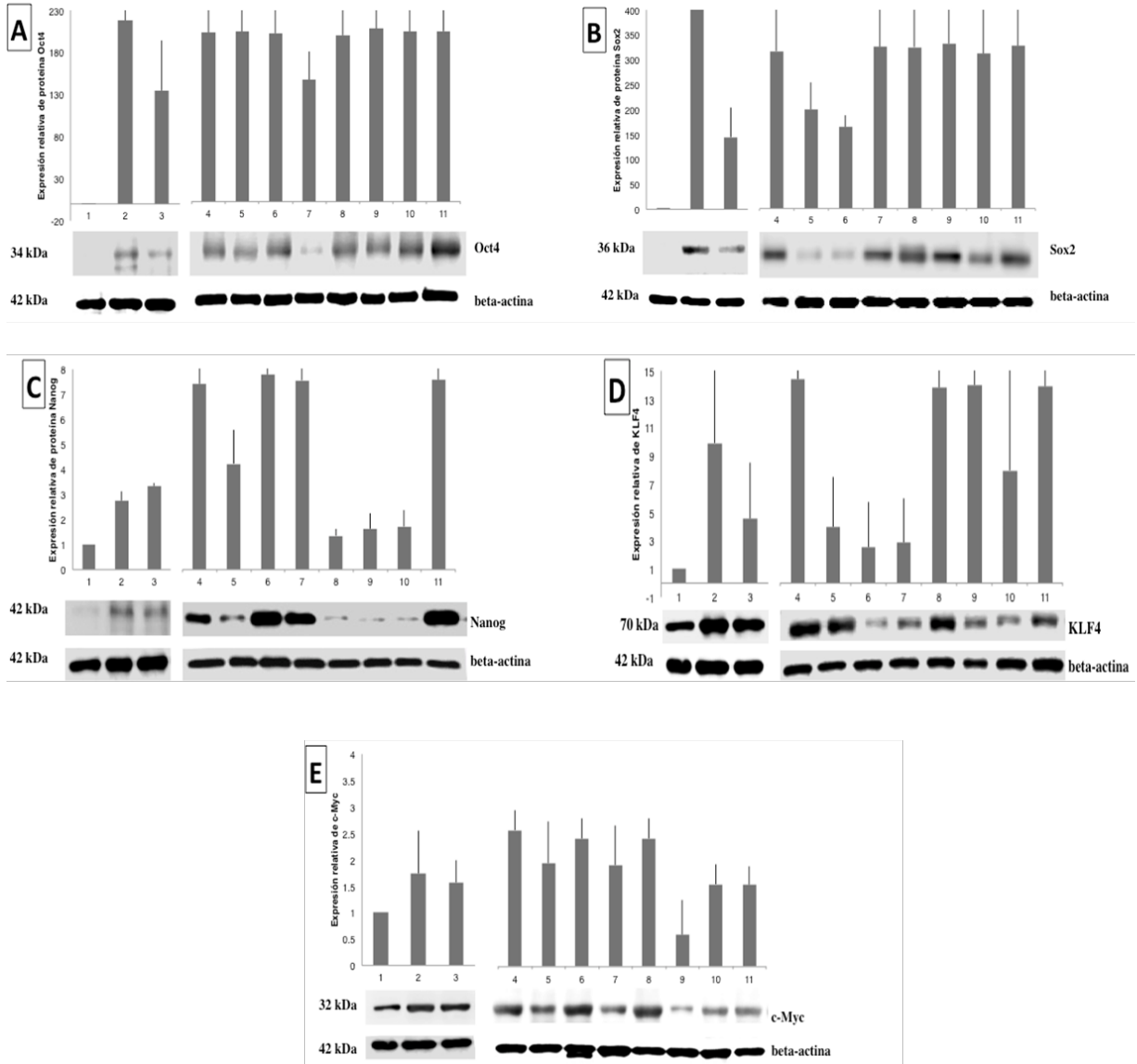
**4.1 Células Troncales Cancerosas: Factores De Transcripción asociados a tumorigenicidad: Los factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc se expresan en cáncer cervicouterino e inducen tumorigenicidad en una línea celular no tumorigénica.**

### **4.1.1. Biopsias derivadas de CaCU sobreexpresan los factores de pluripotencia y troncalidad OSNKM.**

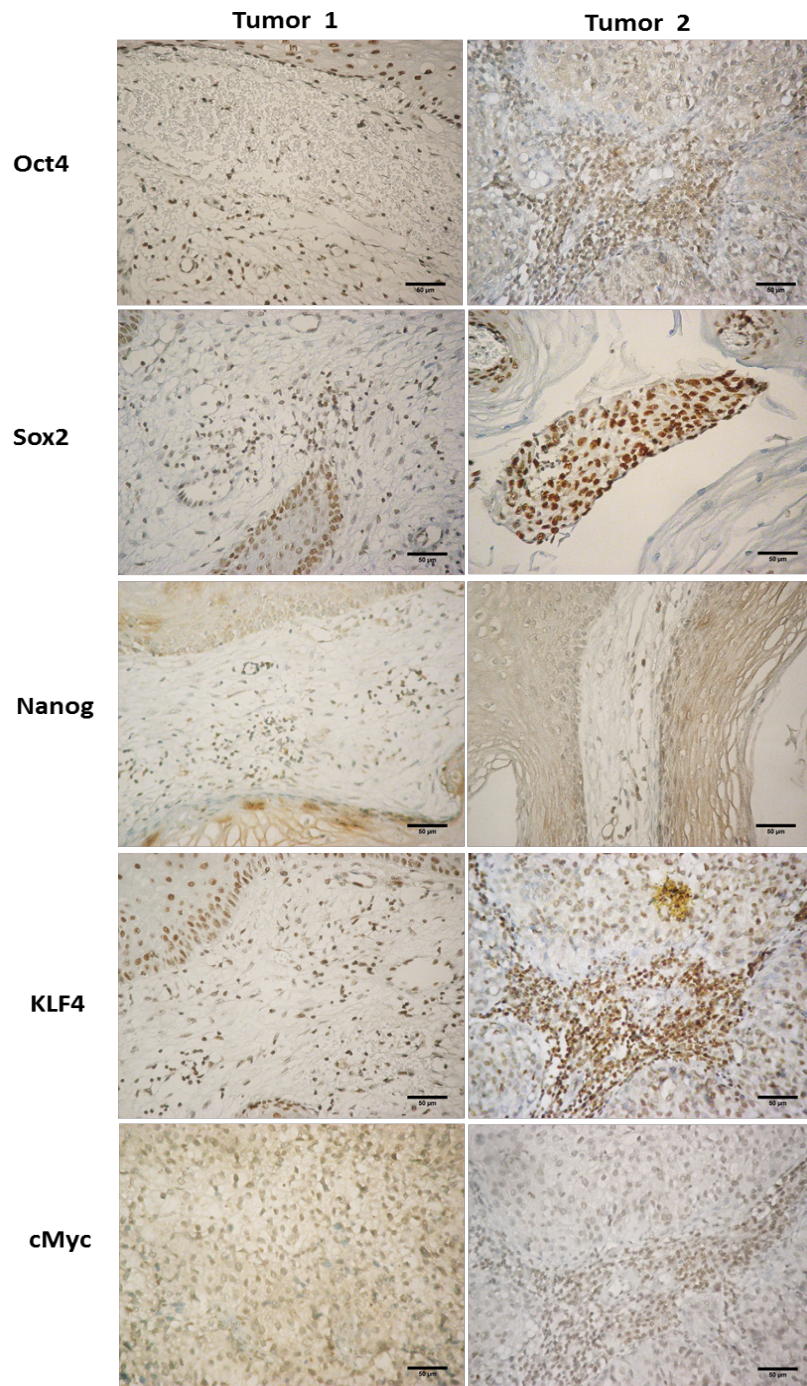
Para determinar la expresión de los factores de pluripotencia y troncalidad OSNKM en muestras de CaCu, se realizó Western Blot y se corroboraron estos análisis por Inmunohistoquímica. Los datos revelaron que todos los factores (Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc) se encuentran sobreexpresados en las 10 muestras de CaCu analizadas en comparación con una muestra de tejido no tumoral procedente de una histerectomía completa por diagnóstico no maligno (Figura 1A-E). La sobreexpresión de estos marcadores en estas biopsias, nos sugiere que podrían jugar un rol fundamental en el CaCu.

El análisis por inmunohistoquímica de cuatro de las muestras anteriores, previamente analizadas por Western Blot corroboró la positividad de las proteínas OSNKM en el 100% de los casos en el componente tumoral (Figura 2); así mismo fue posible conocer su localización dentro de la célula. En el caso de Nanog, nuestros resultados muestran que en biopsias de CaCU, se encuentra principalmente en citoplasma (Figura 2); sin embargo por ser un factor transcripcional, esperábamos encontrarlo en núcleo. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Gu en el 2012, no existen reportes de cuál sería la función de Nanog en el citoplasma.

Estos resultados son muy interesantes, porque ya se ha reportado ampliamente que estos factores son marcadores de pluripotencia y troncalidad, sin embargo, su expresión en células tumorales, deja hacer notar que deben tener una función crucial en la biología molecular de esta población celular.



**Figura. 1. Los factores OSNKM están expresados en CaCU.** Los factores OSNKM están sobreexpresados en tumores de CaCU comparado con una muestra de tejido cervico.uterino no tumoral. Se usó anti- $\beta$ -actina como control de carga. La expresión de OSNKM se examinó en 10 muestras de CaCU. Los números consecutivos indican el número de muestra, el 1 es el tejido normal o no tumoral y del 2 al 11 son muestras de biopsias de CaCU. Los experimentos fueron hechos por triplicado, los valores se expresan como media  $\pm$  la desviación estándar (normalizado a beta-actina).



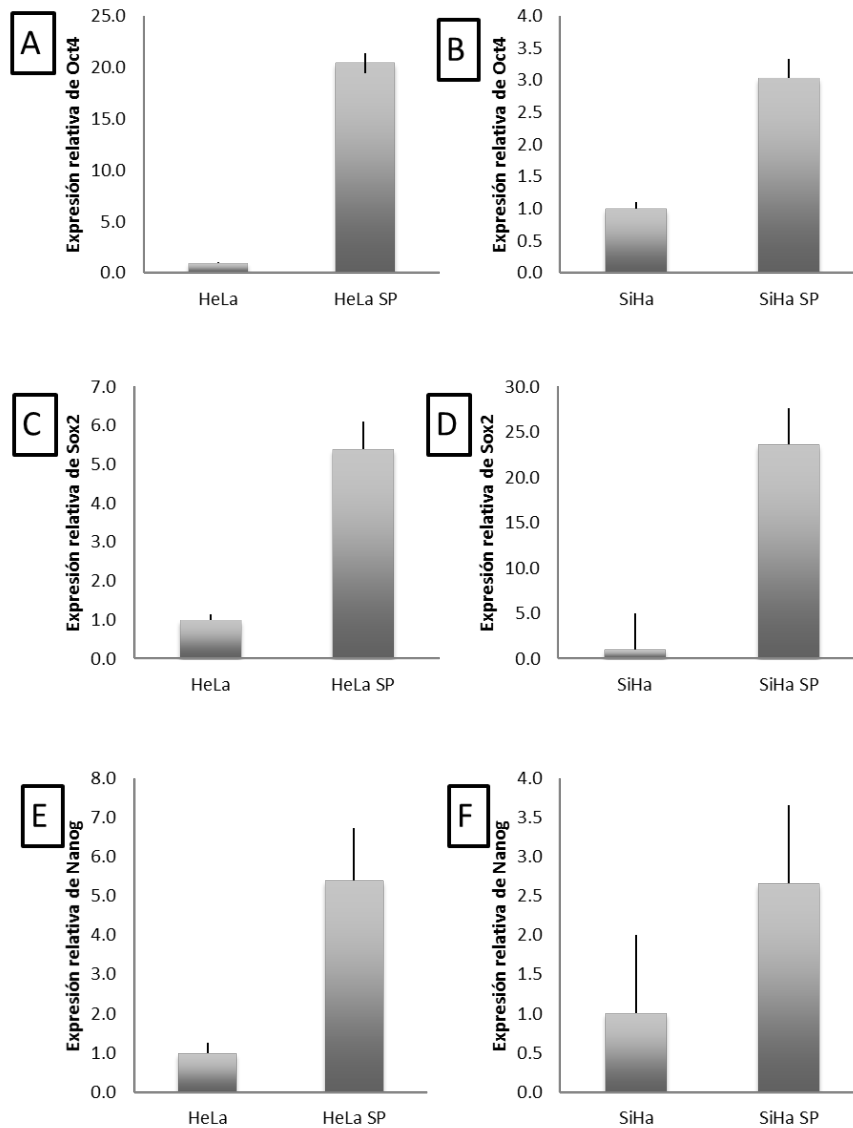
**Figura 2. Localización celular de los factores OSNKM.** inmunohistoquímicas representativas de la expresión de los factores OSNKM. La localización de los factores es nuclear, a excepción de Nanog que es observado en citoplasma.

#### **4.1.2. Los factores OSNKM están presentes en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas de CaCu e induce la formación de esferas en HaCaT.**

Los factores OSNKM, están ampliamente descritos en la literatura como marcadores de células troncales normales y pluripotentes; sin embargo, aún no se ha elucidado si son también marcadores de CTC. En nuestro grupo de trabajo, se han aislado y caracterizado poblaciones enriquecidas en células troncales cancerosas derivadas líneas celulares de CaCu (López, 2012; Ortiz-Sánchez, 2016). Por medio de RT-qPCR encontramos que Oct4, Sox2 y Nanog se encuentran sobreexpresados en estos cultivos enriquecidos en CTC, crecidos en condiciones no adherentes o de formación de esferas, de las líneas celulares HeLa (Figura 3A, 3C, 3E) y SiHa (Figura 3B, 3D, 3F) comparándolos con su contraparte de cultivo heterogéneo que crece en monocapa. Al evaluar la presencia de Oct4 y Sox2 en HaCaT, encontramos que si se expresan, pero su localización es citoplasmática (Figura S2).

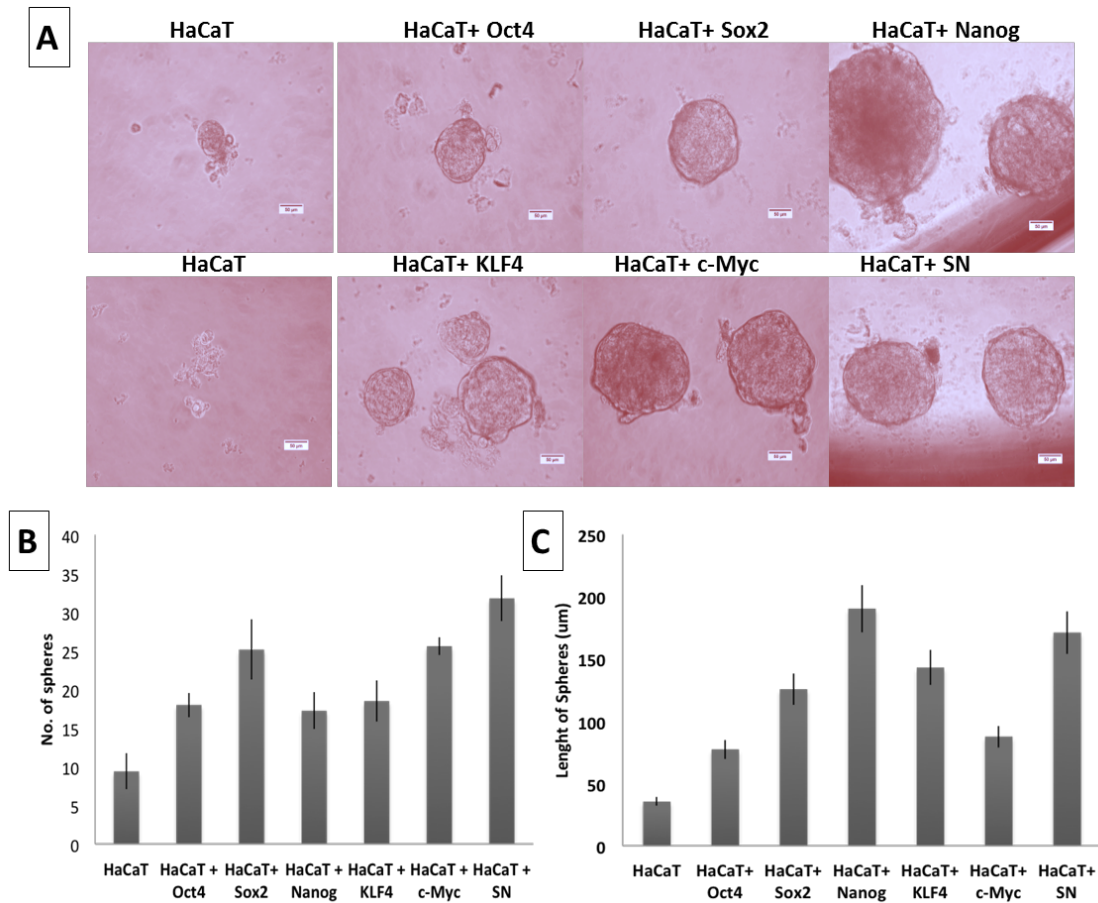
La sobreexpresión de estos factores en poblaciones enriquecidas en CTC nos permitió pensar que sobreexpresar estos factores en la línea celular HaCaT, la cual no es tumorigénica, sería posible inducir la tumorigenicidad al formarse cultivos de esferas *in vitro* y la capacidad de formar tumores *in vivo*. En un primer abordaje, las células HeLa y HaCaT tienen eficiencias de formación de esfera similares; sin embargo, las esferas formadas por HaCaT apenas alcanzan un diámetro de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que esferas formadas por HeLa superan los 600  $\mu\text{m}$  (Figura S1).

Continuamos con la sobreexpresión de los factores OSNKM en HaCaT mediante una transfección transitoria utilizando plásmidos pCDNA 3.1 con el inserto de interés. Luego de 72 h de la transfección, se realizó el ensayo de formación de esferas evaluando la formación de esferas y el tamaño de estas esferas. Las células HaCaT que sobreexpresan los factores OSNKM de manera individual, aumentan su eficiencia de formación de esferas, así como el tamaño de estas esferas comparado con HaCaT que no es transfectada (Figura 4). La mayor eficiencia de formación de esferas se obtuvo cuando se co-transfectaron los factores Sox2 y Nanog.



**Figura 3. Los niveles de RNA mensajero de Oct4, Sox2 y Nanog son altos en cultivos en esferas.** Se realizó RT-qPCR para analizar los niveles de RNA mensajero de los factores Oct4, Sox2 y Nanog; se observó una sobreexpresión en los cultivos en esferas enriquecidos en CTC derivadas de las líneas celulares HeLa y

SiHa en comparación con Los cultivos en monocapa. Experimentos por triplicado y los valores se expresan como promedio + el error estándar (normalizado con B2M).



**Figura 4. La presencia de los factores OSNKM aumenta la formación de esferas en HaCaT .** Morfología de los cultivos en esfera 10 días después de la siembra y la transfección (A), Al transducir los factores OSNKM en HaCaT aumenta el número de esferas que forma (B) y estas esferas son de mayor tamaño (C). Nanog es quien induce la formación de esferas de mayor tamaño, Sox2 favorece la formación de un mayor número de esferas, pero la combinación de estos dos factores mejora tanto la eficiencia como el tamaño de las esferas. La barra de escala es de 50 µm. Experimentos por triplicado, los valores se muestran como el promedio ± la desviación estándar.

#### 4.1.3. Los factores OSNKM inducen un fenotipo tumoral en HaCaT.

Para evaluar la inducción de la tumorigenicidad por los factores OSNKM en células HaCaT, se generaron partículas lentivirales para obtener células que expresaran de manera estable a Oct4, Sox2 y Nanog. Para valorar la infectividad de estas partículas lentivirales utilizamos la proteína verde fluorescente (EGFP) en las células HeLa y HaCaT. Mediante microscopía y citometría de flujo observamos porcentajes mayores al 50% de las células HeLa (Figura S2A) y HaCaT (Figura S2B) positivas para EGFP.

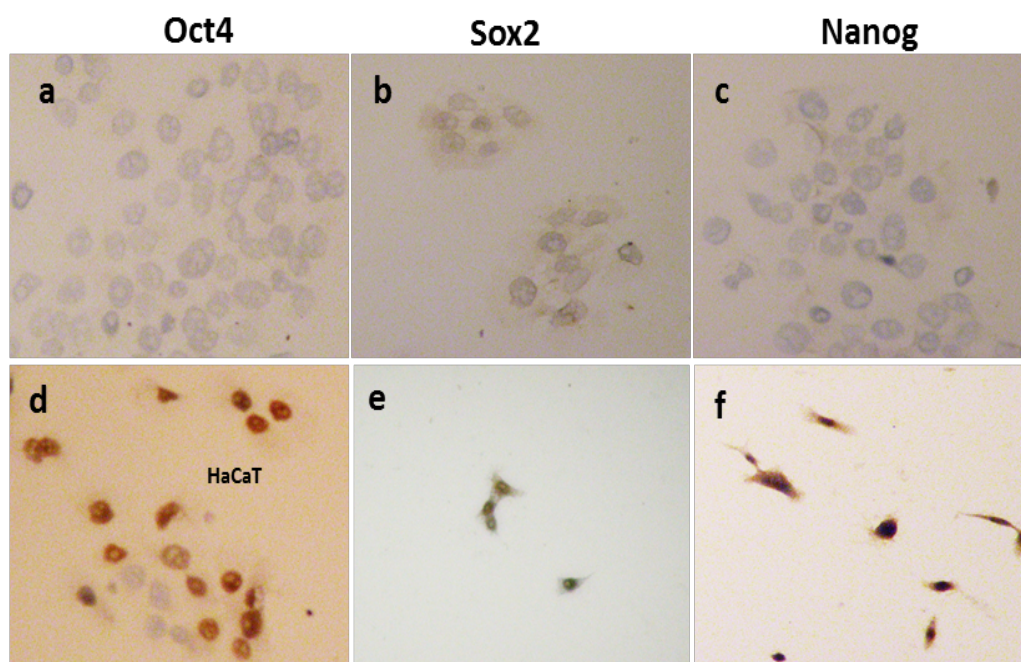
**Tabla 1. Los factores Oct4, Sox2 y Nanog inducen tumorigenicidad *in vivo*.**

<b>Condición</b>	<b>Tamaño del tumor</b>	<b>Tumor/ Inoculaciones</b>
HeLa	++++	6/6
HaCaT/EGFP	-	0/6
HaCaT	-	0/6
HaCaT/Oct4	+	2/6
HaCaT/Sox2	++	2/6
HaCaT/Nanog	+++	1/6
HaCaT/Sox2/Nanog	+++	3/6

+ Representa al tamaño de los tumores, a mayor cantidad de símbolos, mayor el tamaño del tumor. - Representa la ausencia o no formación de tumor.

Mediante inmunohistoquímica corroboramos la expresión de las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog en las células HaCaT después del periodo de selección. Observamos a los factores en el núcleo (Figura 5). Estas células fueron inoculadas a ratones inmunodeficientes nu/nu y como mostramos en la Tabla 1, HaCaT/Oct4, HaCaT/Sox2 y HaCaT/Nanog así como la combinación de HaCaT con Sox2 y Nanog formaron tumores palpables después de 7 semanas, mientras que las células HaCaT no desarrollaron tumor. La inoculación de 2 millones de células HeLa generan un tumor grande, mientras que hasta 8 millones de células HaCaT no forman tumor. Esta evidencia experimental confirma que los factores de troncalidad y pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog pueden inducir tumorigénesis en células no tumorigénicas.

Las células HaCaT que fueron transducidas con los factores Oct4, Sox2 y Nanog adquirieron la capacidad de formar tumores. HaCaT con Nanog formó tumores grandes en baja proporción mientras que Sox2 y Oct4 formaron más tumores, aunque de menor tamaño. La combinación de Sox2 y Nanog parece favorecer la tumorigenicidad. HeLa forma tumores grandes en cada inoculación, mientras que HaCaT por sí sola no genera tumor. El número de tumores formados y el número de inoculaciones realizados se indican para cada condición como número fraccionario (Tabla 1).





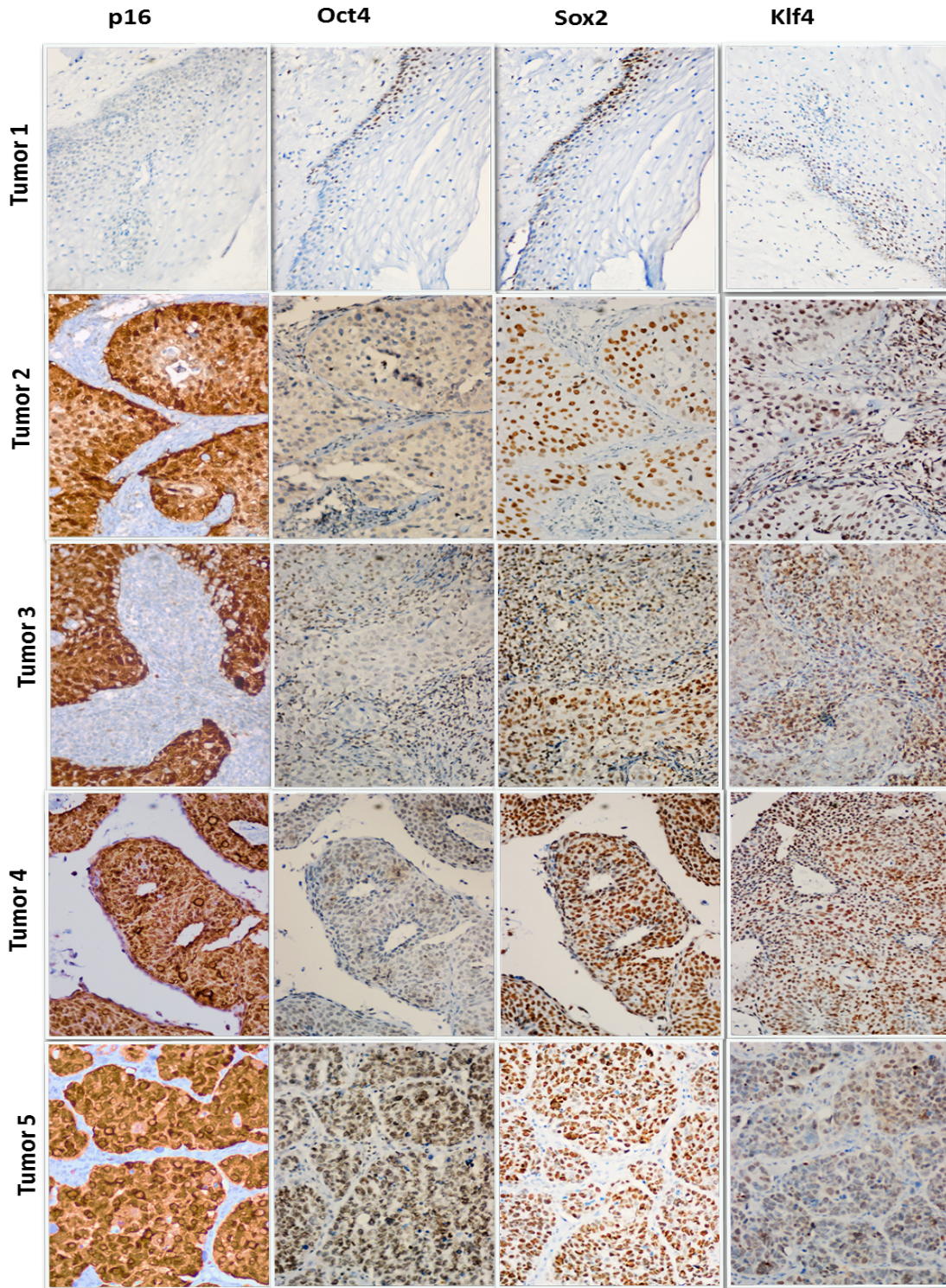
**Figura 5. Los factores Oct4, Sox2 y Nanog presentes en HaCaT transducidas. (OSN) utilizando inmunohistoquímica en HaCaT estable para OSN,** Por inmunohistoquímica se comprueba la presencia de los factores Oct4, Sox2 y Nanog inducidos por las partículas lentivirales en HaCaT y seleccionadas con Puromicina. HaCaT control (a, b, c); HaCaT que sobreexpresa Oct4 (d), Sox2 (e) y Nanog (f).

#### **4.1.4. Oct4 y Sox2 en biopsias de tumores de CaCU muestran asociación con la histopatología o la respuesta clínica.**

Dado el papel que encontramos de los factores en la tumorigénesis, decidimos evaluar su expresión en muestras de pacientes de CaCU de quienes ya se conoce la respuesta clínica al tratamiento administrado a cada una. Esta respuesta fue clasificada en Respuesta completa y Respuesta no completa, esta última contempla a quienes progresaron o recurrieron con la actividad tumoral.

Empleamos inmunohistoquímica para evaluar la expresión de Oct4, Sox2 y KLF4, así como p16 como marcador relacionado con la presencia de VPH y el grado de displasia en las muestras de pacientes (Figura 7) y la histopatología fue determinada con apoyo de un patólogo. La histopatología se clasificó en No tumoral y Tumoral, abarcando dentro de este último los componentes celulares Cáncer *in situ*, Cáncer invasor y Componente inflamatorio, elementos que fueron identificados en muchos de los casos.

La asociación entre de la presencia de los factores y la histopatología se hizo mediante la prueba de F de Fisher exacta encontramos una relación entre la histopatología tumoral y la expresión de Oct4; esta asociación fue todavía mayor para Sox2 (Tabla 2). Al evaluar si existe una asociación con la respuesta clínica al tratamiento, el factor Oct4 presentó una asociación con una respuesta favorable, no así la presencia de Sox2 (Tabla 3). Muestras derivadas de pacientes con respuesta completa a tratamiento son mayormente positivas a Oct4.



**Figura 7. Los factores OSNKM se expresan en CaCU y pueden asociarse a la histopatología y respuesta clínica. Los factores OSNKM están sobreexpresados en células tumorales de CaCu. Se usó p16 como indicador de la presencia de VPH y**

el grado de lesión. La expresión de Oct4, Sox2 y KLF4 se examinó en 44 tejidos de CaCU de quienes se conoce la respuesta clínica al tratamiento. Se muestran solo 5 muestras.

**Tabla 2. Asociación entre el componente tumoral y los factores Oct4 y Sox2.** La evaluación de la asociación mediante la prueba de F de Fisher exacta muestra una dependencia entre el componente tumoral y la expresión de Oct4; para el caso de Sox2, esta asociación es mayor.

Factor	Componente histopatológico		Total	Valor de P
	No tumoral	Tumoral		
Oct4				
Positivo	0	21	21	0.0207
Negativo	5	15	20	
Total	5	36	41*	
Factor	Componente histopatológico		Total	Valor de P
	No tumoral	Tumoral		
Sox2				
Positivo	0	30	30	<0.0001
Negativo	8	8	16	
Total	8	38	46*	

\* Total de observaciones de los componentes celulares en las muestras analizadas.

**Tabla 3. Asociación entre la respuesta clínica al tratamiento y los factores Oct4 y Sox2.** La evaluación de la asociación mediante la prueba de F de Fisher exacta muestra una aparente dependencia entre la expresión de Oct4 y una mejor respuesta al tratamiento; no así para el caso de Sox2.

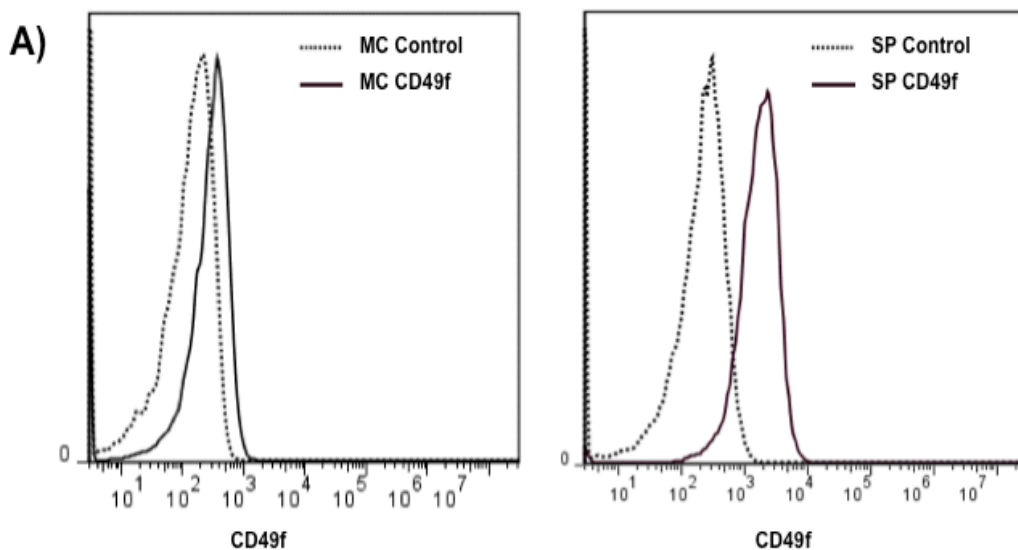
Factor Oct4	Respuesta clínica al tratamiento		Total	Valor de P
	Completa	No completa		
Positivo	13	8	21	0.0489
Negativo	4	11	15	
Total	17	19	36*	
Factor Sox2	Respuesta clínica al tratamiento		Total	Valor de P
	Completa	No completa		
Positivo	17	13	30	0.4381
Negativo	3	5	8	
Total	20	18	38*	

\* Total de observaciones de los componentes celulares en las muestras analizadas.

## 4.2 Células Troncales Cancerosas: Terapia Para Sensibilizar a las Células Troncales Cancerosas utilizando Resveratrol.

### 4.2.1. La población enriquecida en células troncales cancerosas responde pobremente al tratamiento con Etopósido (VP16).

Se utilizó la línea celular HeLa, obtenida a partir de un adenocarcinoma del cuello uterino, para obtener cultivos enriquecidos en CTC por formación de esferas en suspensión, modelo previamente caracterizado en el laboratorio (López, et al., 2012; Ortiz-Sánchez, et al., 2017). Se inició un cultivo de HeLa monocapa (ML) en condiciones no adherentes a una baja densidad celular (1000 células/mL) en medio libre de suero por siete días, el resultado fue un cultivo de esferas provenientes de HeLa (HeLa SP), las cuales se encontraban enriquecidas en células con propiedades similares a las llamadas Células Troncales Cancerosas (CTC). Esta población fue disgregada y marcada con el anticuerpo CD49f, encontramos que 84.9% de las células que conforman las esferas son positivas para CD49f, marcador específico de CTC (Figura 1A-B).

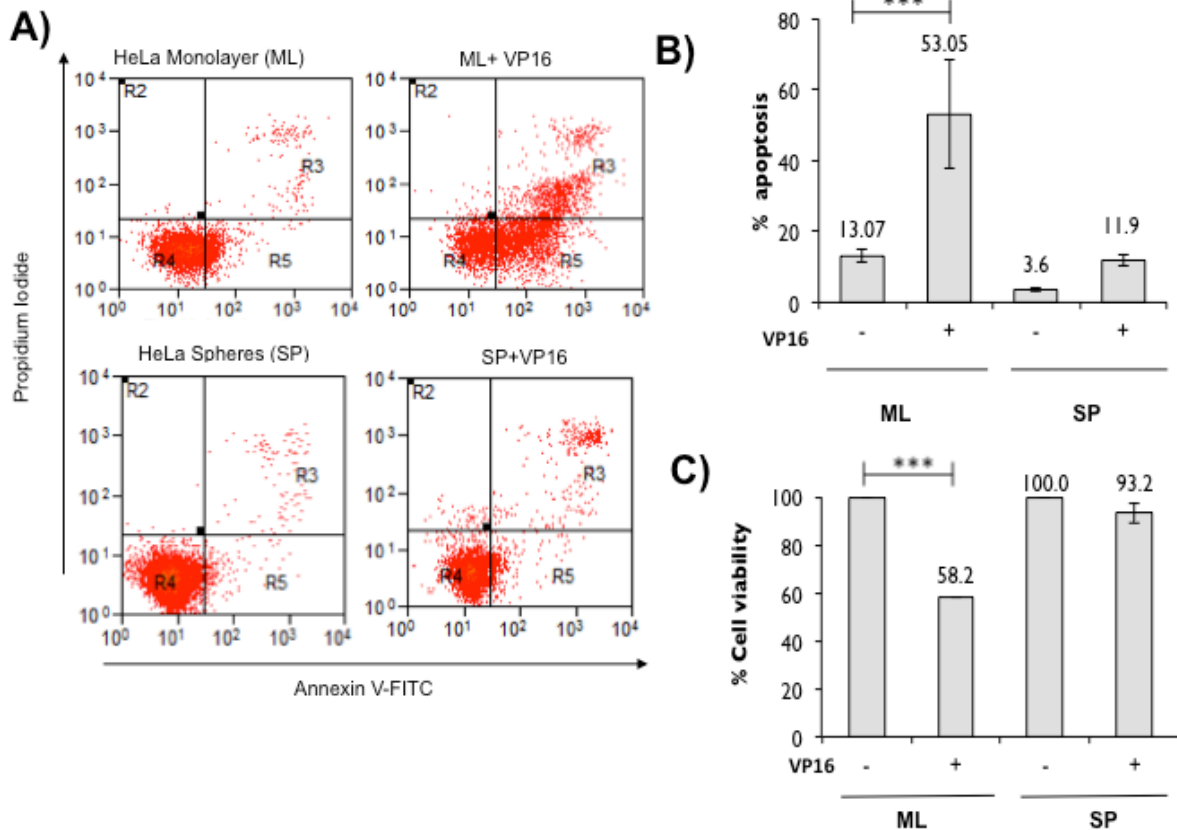


**B)**

Condición	Monocapa (MC)	Esferas(SP)
Isotipo	0.01%	1.23%
+CD49f	0.76%	84.9%

**Figura 1. Esferas derivadas de una línea celular de Cáncer Cervicouterino (HeLa) son positivas para CD49f, un marcador específico de células troncales cancerosas.** Se cultivaron células monocapa HeLa (ML) y células HeLa SP durante 48 horas y 7 días, respectivamente. Para la detección de células CD49f se fijaron y se tiñeron con anticuerpo CD49f-PE durante 45 min (véase Materiales y Métodos). En el histograma se muestra la distribución de fluorescencia de anticuerpos isotipo (control) y CD49f-PE anticuerpo. A) Los gráficos muestran un aumento evidente en la fluorescencia cuando se detectó CD49f en células SP pero no en células ML cuando se compararon con el anticuerpo isotipo. B) La tabla muestra los porcentajes de células CD49f en HeLa ML (0,76%) y HeLa SP (84,9%).

El cultivo de de esferas derivadas de HeLa con siete días de crecimiento fue expuesto a 5.8 µg/mL del fármaco Etopósido (VP16), concentración que corresponde a la concentración inhibitoria media (CI50) para el cultivo en monocapa. La viabilidad celular y el porcentaje de apoptosis fueron evaluadas después de 24 horas de exposición. No se observó ningún efecto de VP16 sobre la viabilidad celular de las esferas, pero si sobre los cultivos convencionales (comparándolos con los cultivos correspondientes sin exposición al fármaco; Figura 3B-C). Así mismo, no se observó inducción de apoptosis en las esferas después de la exposición a VP16, el porcentaje de células es bajo lo que indica que cerca del 90% de la población no se ve afectada por el fármaco (Figura 3A-B). El 50% de HeLa se ve afectada por la exposición Etopósido (datos no mostrados) lo que indica que esferas derivadas de HeLa es resistente o no responde al tratamiento con Etopósido.

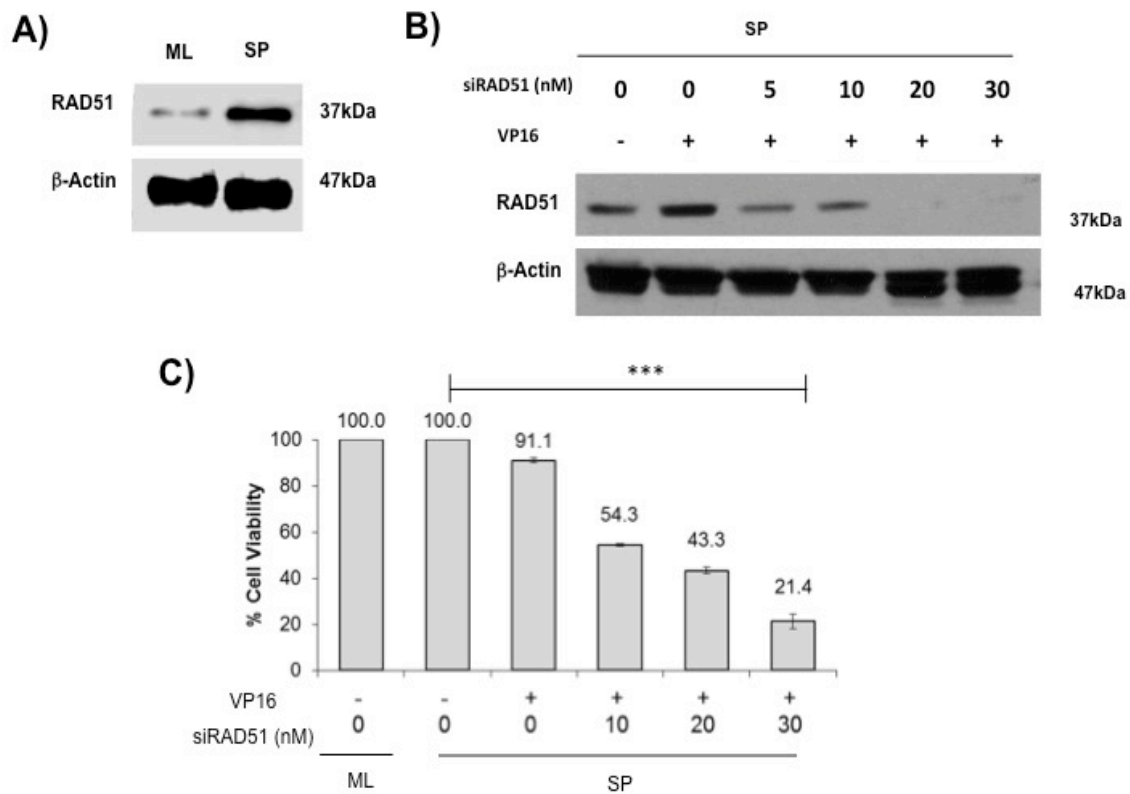


**Figura 3. Los cultivos de esferas no responden al tratamiento con Etopósido (VP16).** (A-B) El porcentaje de células en apoptosis después de la exposición a VP16 en esferas derivadas de HeLa es bajo (11.9%) indicando que cerca del 90 % de la población no se ve afectado por el fármaco. MTT, Bromuro de metiltiazoltetrazol. CI50, concentración inhibitoria media. (C) Viabilidad celular evaluada mediante MTT, el cultivo de HeLa Esferas no es afectado por 5.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Etopósido (VP16) después de 24 horas de exposición manteniéndose similar al cultivo sin exposición. Esta concentración corresponde a la CI50 de HeLa crecida en monocapa.

#### 4.2.2. Las Células troncales cancerosas sobreexpresan RAD51 y disminuyen su viabilidad cuando se inhibe RAD51.

Los cultivos enriquecidos en CTC, crecidos en esferas, sobre expresan RAD51, una proteína clave en la reparación homologa (Figura 4A). Los cultivos de HeLa fueron tratados con VP16 a 5.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 horas y después a concentraciones crecientes (5, 10, 20 y 30nM) de siRNas contra RAD51 (siRAD51).

Mediante Western Blot se observó que la proteína RAD51 es inhibida totalmente con 30nM de siRAD51 después de exponer el cultivo al fármaco (Figura 4B). La viabilidad celular disminuye hasta cerca del 10% después de coadyuvar con siRAD51 al cultivo expuesto al fármaco (Figura 4C). El VP16 tiene efectos genotóxicos en la célula y si RAD51 es empleado para reparar el daño causado, el resto de la población que no se ve afectada inicialmente por la presencia del fármaco disminuye al eliminar la cantidad de RAD51 presente.



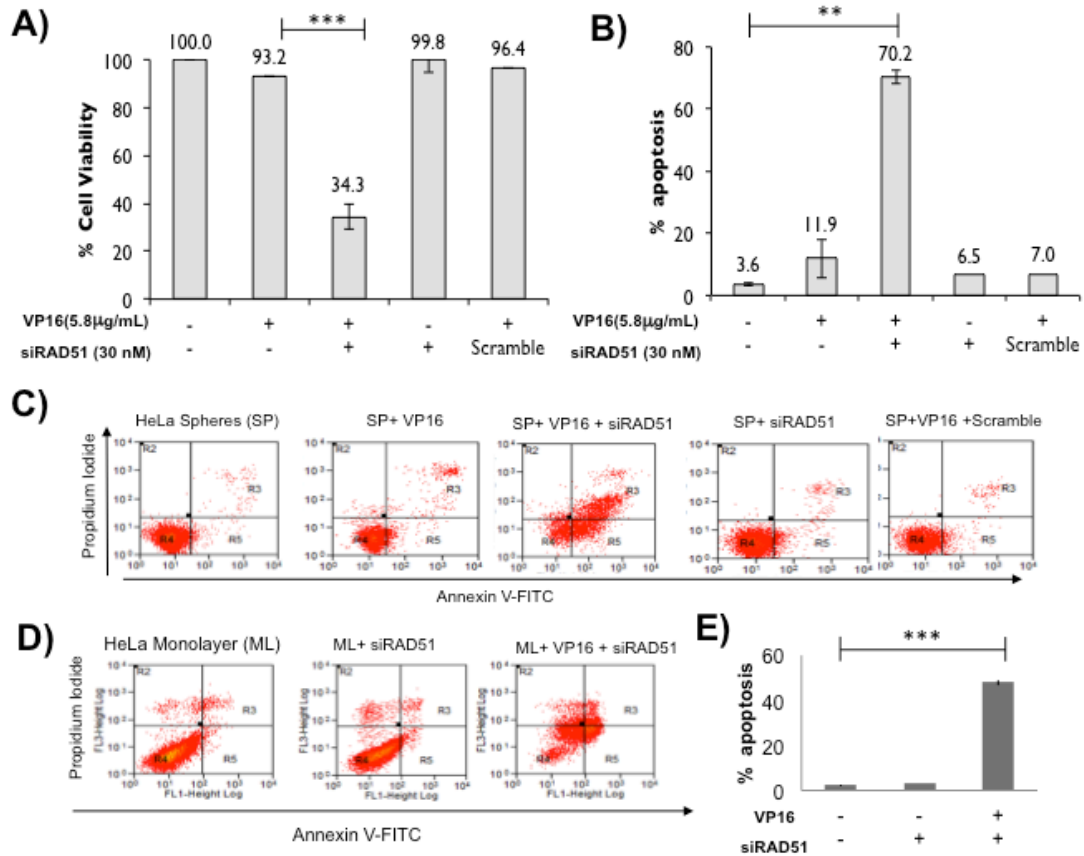
**Figura 4. El silenciamiento de RAD51 disminuye la viabilidad de HeLa tratadas con VP16.** (A) La población enriquecida en CTC sobreexpresa RAD51 (SP) comparado con la población crecida en monocapa. (B) El silenciamiento de RAD51 en HeLa es dependiente de la concentración de siRNAs, el Western Blot muestra que la cantidad de proteína de RAD51 es inhibida con 30 nM de siRNAs después de causar daño genotóxico con VP16 a 5.8  $\mu$ g/mL. (C) La viabilidad celular de HeLa disminuye al aumentar la concentración de siRNAs contra RAD51 (siRAD51)



después de exponer a VP16. La ausencia de la proteína RAD51 sensibiliza a las CTC al daño generado por el etoposido.

#### **4.2.3. El silenciamiento de RAD51 favorece la muerte celular de HeLa Esferas tratadas con VP16.**

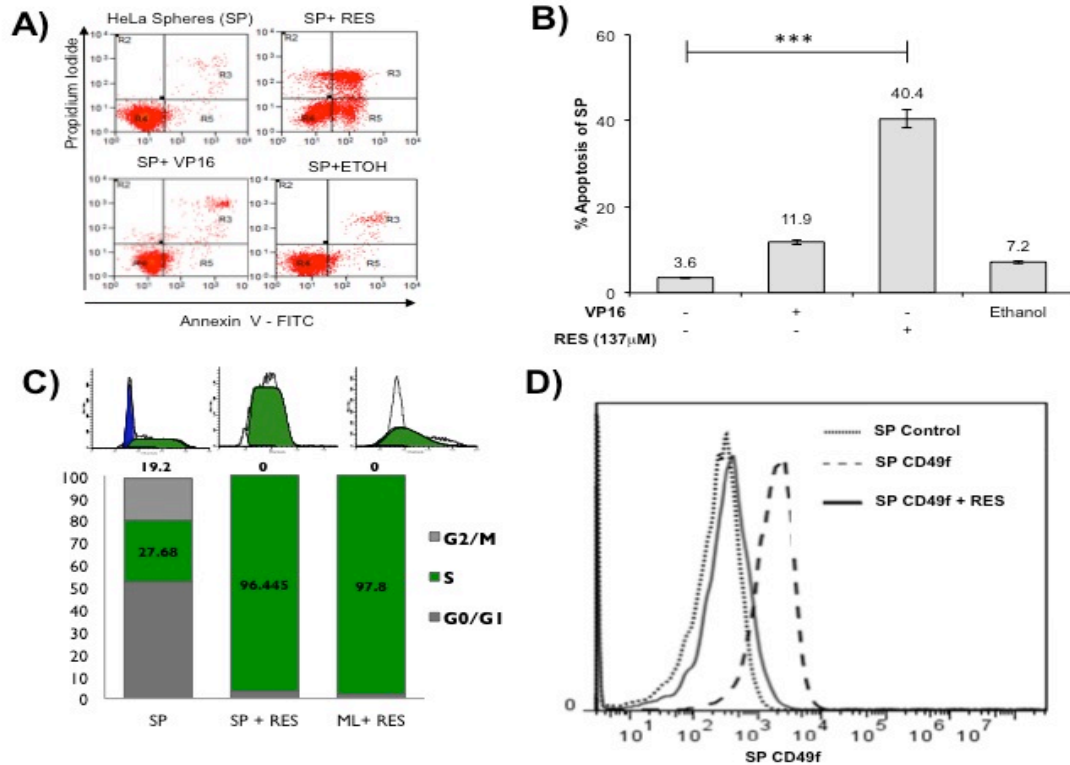
La existencia de daño genotóxico en la célula favorece la expresión de la proteína RAD51, el fármaco Etopósido aumenta la cantidad de RAD51 y solo las células con la habilidad de reparar eficientemente el daño sobreviven. El tratamiento con VP16 de HeLa Esferas induce la expresión de la proteína RAD51 debido a que esta se activa como respuesta al daño generado por rupturas de doble cadena del ADN, la proteína se silenció con siRNAs dirigidos a RAD51 (siRAD51) alcanzando total la inhibición a una concentración de 30nM (Figura 5A). Ahora estas células, que no eran sensibles al tratamiento con VP16, no logran sobrevivir al inhibirse a RAD51. A las 72 horas después de la transfección, la viabilidad celular del cultivo se redujo hasta 34% (Figura 5B) y una inducción de la apoptosis en al menos el 70% de la población (Figura 5C). La inhibición de RAD51 favorece la muerte celular después de exponer al cultivo enriquecido en células troncales cancerosas a Etopósido. El silenciamiento de RAD51 en HeLa Monocapa aumenta hasta un 50% la apoptosis (Figura 5D-E).



**Figura 5. El silenciamiento de RAD51 en cultivo de HeLa Esferas favorece la muerte celular por Etopósido.** (A) HeLa Esferas responden al tratamiento con VP16 en presencia de siRAD51 a 30nM, disminuyendo así la viabilidad celular. (B-C) La inhibición de la proteína RAD51 mediante siRNAs en HeLa Esferas favorece el efecto de VP16 al aumentar el porcentaje de células en apoptosis después de la exposición al fármaco. Como control de la especificidad de los siRNAs contra RAD51 (siRAD51), se usaron 30nM de una mezcla de siRNAs aleatorios (Mix siRNAs). (D-E) La inhibición de RAD51 en HeLa crecida en monocapa aumenta la apoptosis hasta un 51%.

#### **4.2.4. La población enriquecida en células troncales cancerosas responde al tratamiento con Resveratrol y disminuye selectivamente la población CD49f.**

Trabajos anteriores de nuestro grupo sugiere que RES inhibe la expresión de los genes de reparación del ADN, incluyendo RAD51 (Leon-Galicia, 2012). Se trataron las HeLa SP con RES y se utilizó citometría de flujo para examinar si RES induce apoptosis en cultivos HeLa SP. Observamos un aumento de los niveles de apoptosis (40,4%) en HeLa SP tratados con RES, en comparación con esferas tratadas sólo con VP16 (11,9%) (Figura 6A-B). Debido a que se ha reportado que el RES puede detener la progresión del ciclo celular, analizamos el ciclo celular de HeLa SP utilizando citometría de flujo. Se observó una acumulación de la población celular en la fase S (96,4%) (Figura 6C) cuando las esferas se tratan durante 48 h con 137  $\mu$ M RES. Se usaron células HeLa ML tratadas con VP16 o RES como control. Cuando los cultivos de las esferas se expusieron durante 48 h a 137  $\mu$ M de RES, se tiñeron con anticuerpo CD49f y se analizaron por citometría de flujo, las células CD49f positivas disminuyeron de 84% a 16%, indicando claramente que el Resveratrol disminuye selectivamente la población positiva para CD49f (Figura 6D). Este es un nuevo e interesante dato, no reportado previamente que puede ser el sustento teórico para la industrialización y uso del Resveratrol en coadyuvancia con la terapia convencional vigente.

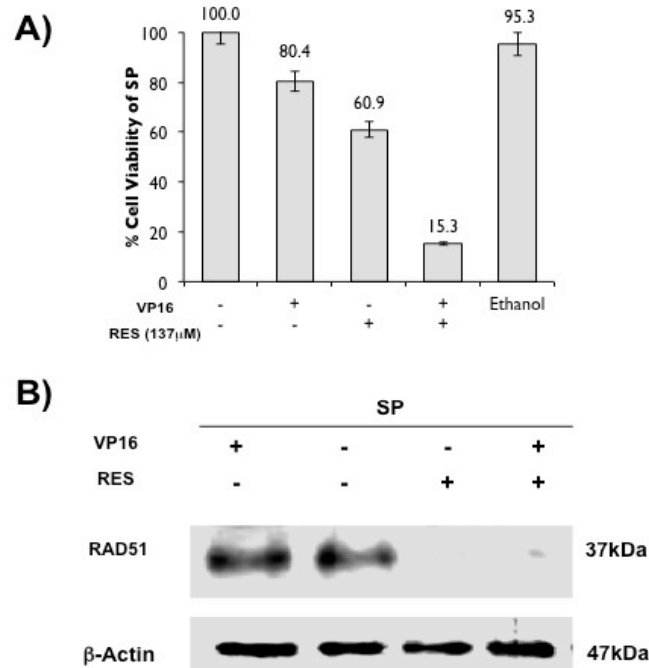


**Figura 6. El cultivo de HeLa Esferas es sensible al tratamiento con Resveratrol (RES).** A-B) Resveratrol (RES) induce mayores niveles de apoptosis de los cultivos HeLa esferas (SP) en comparación con los controles. Se utilizó etanol como vehículo. La apoptosis se evaluó mediante el ensayo de anexina V. C) RES indujo la detención del ciclo celular en fase S tanto en cultivos HeLa ML como SP. Las células HeLa bajo ambas condiciones se trataron con 137  $\mu$ M de RES durante 72 h, se tiñeron con yoduro de propidio (PI) durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron sometidas a análisis de citometría de flujo para determinar la distribución celular en cada fase del ciclo celular. D) Los gráficos muestran la distribución de fluorescencia para el isotipo de anticuerpo (control) y el anticuerpo CD49f-PE. Los gráficos muestran que la subpoblación positiva para CD49f disminuye significativamente cuando HeLa SP enriquecido en CSC se tratan con Resveratrol durante 72h (de 84% a 16%). P <0,05; \*\* p <0,01, y \*\*\* p <0,001.

#### **4.2.5. El tratamiento con el Resveratrol disminuye los niveles de la proteína RAD51 y potencia el efecto antineoplásico del etoposido.**

A continuación, los cultivos de la esfera se expusieron durante 48 horas a 5,8 µg / ml de VP16 o 137 µM de RES, y la viabilidad celular se midió usando ensayos de MTT (Figura 7A). En estas condiciones, la viabilidad celular de HeLa SP disminuyó después de VP16 o RES hasta 80,4 o 60,9%, respectivamente. Interesantemente, la reducción más fuerte a 15,3% en la viabilidad celular de HeLa SP se observó cuando ambos compuestos se añadieron simultáneamente. Finalmente, se investigaron los niveles de proteína RAD51 en HeLa SP después del tratamiento con RES. Como control de RAD51 expresión, se trataron HeLa SP con VP16 (Figura 7B]. El análisis de Western Blot mostró que, en células HeLa SP tratadas con RES, el nivel de proteína RAD51 está fuertemente disminuido en comparación con HeLa SP sin tratamiento, o las esferas tratadas solo con Etoposido (Figura 7B). Cabe destacar que el tratamiento con RES afecta más células cancerosas que las no cancerosas, ya que el tratamiento de una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) con RES mostró que estas células son más resistentes (IC50: 165µM) que las células HeLa (IC50: 137 uM ) (no mostrada).

Resveratrol es un antioxidante, con efectos genotóxicos, además asociado con la inhibición de la maquinaria de reparación de rupturas de doble cadena del ADN en líneas celulares derivadas de cáncer de mama. En los cultivos de HeLa Esferas expuestas a Etoposido y Resveratrol, simultáneamente, se observa una disminución de la cantidad de proteína RAD51, pero la ausencia de esta en el cultivo expuesto solo a RES sugiere además que tiene un efecto sobre la expresión o sobre la regulación de la expresión de RAD51 (Figura 7). Este doble efecto (daño genotóxico e inhibición de la maquinaria de reparación) puede ser uno de los caminos empleados por el compuesto para eliminar a este tipo de poblaciones celulares.



**Figura 7. La presencia de Resveratrol disminuye los niveles de la proteína RAD51.** El cultivo se expuso 72 h a 5,8  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de VP16 en combinación con 137  $\mu\text{M}$  de RES. En estas condiciones, la viabilidad celular medida por el ensayo de MTT se redujo fuertemente (15,3%). Se utilizó etanol como vehículo de control. B) El análisis por Western Blot muestra que el tratamiento con RES (137  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h inhibió la expresión de la proteína RAD51 (similar a siRAD51) en cultivos SP en comparación con HeLa SP sin tratamiento o HeLa SP tratado con Etoposido. Los niveles de proteína RAD51 fueron drásticamente reducidos cuando se trató HeLa SP con Resveratrol solo o junto con Etoposido. Las células HeLa Monocapa (MC) no tratadas también se usaron como control.

## 5. Discusión

En este estudio, mostramos evidencia experimental que indica que los factores de pluripotencia y troncalidad Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc (OSNKM) están expresados en células tumorales de muestras de CaCu. Nuestros resultados son consistentes con los estudios que describen la expresión de Nanog en lesiones cervicales epiteliales (Ye et al., 2008), interesantemente esos reportes y nuestros resultados coinciden en que la localización de nanog es principalmente citoplasmática. Además, mostramos datos *in vitro* e *in vivo* que indican que los factores Oct4, Sox2 y Nanog promueven el fenotipo troncal e inducen la tumorigenicidad en la línea celular HaCaT, la cual no genera tumores en ratones inmunodeficientes, línea celular caracterizada por Boukamp en 1998 (Boukamp, 1989).

Hace más de una década se mostró que, si bien los tumores sólidos humanos están formados por un conjunto heterogéneo de células, son las células troncales cancerosas quienes tienen capacidad de mantener el crecimiento tumoral y generar metástasis (Al-Hajj et al. 2003). Las CTC han sido estudiadas de forma intensiva, principalmente en el contexto del desarrollo embrionario, donde se ha mostrado la existencia de genes y circuitos que regulan su pluripotencia y troncalidad, entre estos se encuentran principalmente los genes OSNKM, los cuales también constituyen el pilar de la medicina regenerativa por su capacidad de inducir un fenotipo troncal y pluripotente en fibroblastos adultos de ratón o humano al ser expresados en combinación de manera exógena (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Nosotros probamos que estas proteínas contribuyen a las propiedades de crecimiento clonogénico o tumorigénico de las CTC de CaCu. Aquí, proporcionamos evidencia convincente de que las células tumorales en muestras de pacientes expresan las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog y son funcionalmente importantes en la regulación del desarrollo del tumor.

Nuestros datos muestran que la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog confiere las propiedades de CTC a HaCaT como la formación de la esfera en condiciones no adherentes, datos no reportados previamente. Estos datos sugieren que la expresión

exógena de OSNKM podría aumentar la tumorigénesis cervical tanto *in vitro* como *in vivo*. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos en los que Sox2 se encontró en esferas de glioblastoma (Song et al., 2016). Nosotros demostramos por primera vez que la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog en una línea celular no tumorigénica confiere la capacidad de formación de tumores en ratones inmunodeficientes nu/nu, por lo tanto, estos factores desempeñan un papel importante en la tumorigénesis, evidencia apoyada por el reporte de Chen en 2008, quien mostró resultados similares en el cáncer de mama con Sox2. Estos resultados también son consistentes con los resultados de Organista et al (Organista et al., 2016) que observó una sobreexpresión de estos factores en lesiones de CaCU en un modelo de ratón transgénico K14E7. Además encontramos que estos factores se expresan en CaCU. Lo que nos lleva a suponer que estos podrían ser blancos terapéuticos para eliminar a las CTC .

En la segunda parte de la investigación, se parte del hecho que las CTC se han identificado en diferentes tipos de cáncer y se consideran responsables de la progresión tumoral, metástasis, resistencia a la terapia y posterior recurrencia del tumor (Dalerba, 2007; A-Hajj, 2007). Por lo tanto se requieren terapias eficientes cuyo blanco sea esta subpoblación celular. Recientemente, se caracterizó una subpoblación enriquecida en CTC derivada de líneas celulares establecidas de CaCu (HeLa, SiHa, CaSki y C-4I) (López, et al., 2012), cuyos datos refieren una sobreexpresión de componentes de la maquinaria de reparación de ADN, entre ellos RAD51, factor clave en la reparación de rupturas de ADN de doble cadena. Interesantemente, en este mismo trabajo se observó que la subpoblación de CTC presentaba mayor resistencia a la radiación y sobreexpresión de CD49f. Además, Ortiz-Sánchez et al. mostró en 2016 otras características fenotípicas de células troncales cancerosas de CaCU, como niveles aumentados de marcadores de pluripotencia y autorrenovación celular (Oct4, Nanog o  $\beta$ -catenina) (Ortiz-Sanchez, 2016). Nuestros datos, revelan por primera vez que la inhibición de RAD51 utilizando el Resveratrol, induce quimiosensibilización de las CTC derivadas de HeLa, línea celular de CaCU.



Los resultados indican que los cultivos de esferas enriquecidos en CTC contienen un alto nivel de RAD51 y son resistentes a la quimioterapia con Etoposido. Hemos planteado la hipótesis de que la supresión de RAD51 podría ser una estrategia para la quimiosensibilización de CTC de CaCU a los efectos citotóxicos de compuestos que dañan el ADN, como el Etoposido. Es probable que la resistencia terapéutica a la radioterapia y los agentes quimioterapéuticos pueda deberse a una reparación de daño al ADN más eficiente, por ejemplo a una capacidad de recombinación homóloga (HR) hiperactiva en los tumores que sobreexpresan RAD51 (Schild, 2009). Si es así, la reducción de RAD51 puede sensibilizar los tumores a la quimioterapia. En este sentido, nosotros utilizamos siRNAs dirigidos a RAD51 y observamos una disminución de la viabilidad celular, así como el aumento de la apoptosis de HeLa SP cuando se trata con Etoposido. Acorde con nuestros hallazgos, trabajos previos propusieron a RAD51 como un blanco terapéutico en varios tipos de cáncer, como glioblastoma (Short, 2011), páncreas (Nagathihalli, 2011), pulmón (Hansen, 2003), colorrectal (Hwang, 2007; Tennstedt, 2013), y otros, incluyendo el cáncer cervical (Hine, 2008; Hine, 2012). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero que reporta el silenciamiento de RAD51 en CTC de CaCU utilizando siRNAs y Resveratrol, como estrategia innovadora para sensibilizar a esta subpoblación al tratamiento con Etoposido. El Resveratrol, es un agente fitoquímico quimiopreventivo, que recientemente ha tenido un considerable interés debido a sus notables efectos sobre la carcinogenesis, incluyendo los procesos de reparación del ADN (Tomé-Carneiro, 2013), en nuestra investigación observamos que este polifenol, disminuye la viabilidad celular, aumenta la apoptosis, e induce el arresto del ciclo celular en la fase S en cultivos enriquecidos en CTC ( HeLa SP). Además se observó disminución de la expresión de la proteína RAD51 y el aumento de la apoptosis en HeLa SP tratados sólo con RES. Anteriormente, se reportó que algunos genes de la maquinaria de Reparación por recombinación homóloga, entre ellos RAD50, RAD51 se encontraban subexpresados en MCF-7, línea celular de Cáncer de mama, cuando esta era tratada con Resveratrol (León-Galicia, 2012). Así mismo en nuestro trabajo demostramos que RES puede afectar a la subpoblación de células enriquecidas en CTC que inicialmente fue resistente a VP16, y se

sensibilizaron al tratamiento con VP16 después de ser tratadas en combinación con RES.

Nuestros resultados nos hacen suponer que el uso de compuestos naturales como el Resveratrol en combinación con las terapias convencionales podría ayudar a disminuir la resistencia de las células troncales cancerosas de cáncer Cervicouterino a la quimioterapia y la radioterapia.

## **6. Conclusiones**

1. Los factores de pluripotencia y troncalidad OSKM-N se encuentran expresados en muestras de cáncer cervicouterino.
2. Oct4, Sox2 y Nanog se encuentran expresados en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas de las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de cáncer cervicouterino.
3. Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog inducen formación de esferas y confieren capacidad tumorigénica en la línea celular HaCaT que es no tumorigénica
4. Los factores de pluripotencia y troncalidad OSKM-N permiten identificar la histopatología tumoral.
5. RAD51 se encuentra sobreexpresado en cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas.
6. Poblaciones enriquecidas en CTC son quimioresistentes al tratamiento con VP16.
7. La inhibición de RAD51 utilizando siRNAs permite su quimiosensibilización al tratamiento con VP16.
8. El Resveratrol, inhibe RAD51 en cultivos enriquecidos en CTC y promueve su muerte celular.

## 7. Perspectivas

Derivado de los resultados obtenidos en esta tesis, se plantea el siguiente trabajo a futuro:

Respecto al estudio de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 y c-Myc es de sumo interés estudiar la participación de los 5 factores en conjunto, para conferir el fenotipo tumoral en la línea celular no tumorigénica (HaCaT), ya que este trabajo únicamente validó la participación *in vivo* de Oct4, Sox2 y Nanog.

Ya que se encontró que Nanog se encuentra expresado a nivel de citoplasma en biopsias de CaCU, resultaría interesante estudiar las condiciones en las cuales se expresa en núcleo o citoplasma.

En este trabajo, no se ha podido esclarecer cabalmente si los factores de transcripción estudiados pueden ser utilizados como factores de pronóstico, para ello se tendría que ampliar el número de muestras analizadas por inmunohistoquímica.

Respecto a la inhibición de RAD51, se encontró que su inhibición sensibiliza a las CTC derivadas de CaCU, sería interesante saber si esta estrategia es útil para sensibilizar CTC derivadas de otros tipos de Cáncer como mama, cerebro, próstata, entre otros.

## 8. Bibliografía

- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.*, 58, 267-284.
- Bianco P, Robey PG.(2001). Stem cell in tissue engineering. *Nature*; 414: 118-21.
- Donovan PJ, Gearhart J.(2001). The end of the beginning for pluripotent stem cell. *Nature*; 414: 92-7.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., ... & Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*, 66(19), 9339-9344.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988.
- Ishii H, Iwatsuki M, et al. (2008). Cancer stem cells and chemoradiation resistance. *Cancer Sci*; 99 (10) 1871 77
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., ... & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648.
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7), 730-737.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *nature*, 432(7015), 396-401.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23), 10946-10951.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., ... & Shelton, A. A. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10158-10163.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111-115.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., ... & Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties

in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 973-978.

Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., ... & Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell*, 1(3), 313-323.

Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... & Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, 67(3), 1030-1037.

Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P., ... & Fan, S. T. (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell*, 13(2), 153-166.

Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., ... & Fuhlbrigge, R. C. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451(7176), 345-349.

Ye, F., Zhou, C., Cheng, Q., Shen, J., & Chen, H. (2008). Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC cancer*, 8(1), 108.

Ji, J., & Zheng, P. S. (2010). Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human pathology*, 41(10), 1438-1447.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.

Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G, Pectasides E. (2008). Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat Rev*;34: 603-13.

Bosch, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., ... & Shan, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(11), 796-802.

López, J., Poitevin, A., Mendoza-Martínez, V., Pérez-Plasencia, C., & García-Carrancá, A. (2012). Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC cancer*, 12(1), 48.

Ortiz-Sánchez, E., Santiago-López, L., Cruz-Domínguez, V. B., Toledo-Guzmán, M. E., Hernández-Cueto, D., Muñiz-Hernández, S., ... & García-Carrancá, A. (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: Phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*, 7(22), 31943.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... & Slukvin, I. I. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*, 318(5858), 1917-1920.

Chen, L., & Daley, G. Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Human molecular genetics*, 17(R1), R23-R27.

Yang, W. T., & Zheng, P. S. (2012). Krüppel-like factor 4 functions as a tumor suppressor in cervical carcinoma. *Cancer*, 118(15), 3691-3702.

Wang, K., Zeng, J., Luo, L., Yang, J., Chen, J., Li, B., & Shen, K. (2013). Identification of a cancer stem cell-like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line. *Oncology letters*, 6(6), 1673-1680.

Ye, F., Zhou, C., Cheng, Q., Shen, J., & Chen, H. (2008). Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC cancer*, 8(1), 108.

Phillips, T. M., McBride, W. H., & Pajonk, F. (2006). The response of CD24<sup>-</sup>/low/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(24), 1777-1785.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756-760.

Maugeri-Saccà, M., Vigneri, P., & De Maria, R. (2011). Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clinical Cancer Research*, 17(15), 4942-4947.

Soberón, L., Rodríguez, M., Soberón, R. L., & Rodríguez, R. B. Resistencia multiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cancer. *La Revista de Investigación Clínica* Vol. 45, no. 5 (1993 sep.-oct.), pp 481-492.

Vinoth, K. J., Heng, B. C., Poonepalli, A., Banerjee, B., Balakrishnan, L., Lu, K., ... & Cao, T. (2008). Human embryonic stem cells may display higher resistance to genotoxic stress as compared to primary explanted somatic cells. *Stem cells and development*, 17(3), 599-608.

Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.

Sobolev, V. S., & Cole, R. J. (1999). trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1435-1439.

Bianchini, F., & Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?. *European Journal of Cancer Prevention*, 12(5), 417-425.

Tseng, S. H., Lin, S. M., Chen, J. C., Su, Y. H., Huang, H. Y., Chen, C. K., ... & Chen, Y. (2004). Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clinical Cancer Research*, 10(6), 2190-2202.

Elattar, T. M., & Virji, A. S. (1999). The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer research*, 19(6B), 5407-5414.

Opipari, A. W., Tan, L., Boitano, A. E., Sorenson, D. R., Aurora, A., & Liu, J. R. (2004). Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer research*, 64(2), 696-703.

Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2006). Time-and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. *Cell Proliferation*, 39(6), 479-493.

Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J (2001). Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* 131:2197–2203.

Wolter F, Stein J (2002). Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. *J Nutr* 132:2082–2086.

Park JW, Choi YJ, Suh SI, Baek WK, Suh MH, Jin IN, et al. (2001). Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis* 22:1633–1639.

Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., ... & Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 11-20.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), 761-771.

Chen, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, R., Liang, J., Yu, W., ... & Shang, Y. (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17969-17978.

Song, W. S., Yang, Y. P., Huang, C. S., Lu, K. H., Liu, W. H., Wu, W. W., ... & Huang, P. I. (2016). Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in

CD133-positive glioblastoma stem cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(10), 538-545.

Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Ocadiz-Delgado, R., García-Villa, E., Bonilla-Delgado, J., Lagunas-Martínez, A., ... & Gariglio, P. (2016). The HPV16 E7 oncoprotein increases the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell self-renewal. *Virology*, 499, 230-242.

Schild, D., & Wiese, C. (2009). Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. *Nucleic acids research*, 38(4), 1061-1070.

Short, S. C., Giampieri, S., Worku, M., Alcaide-German, M., Sioftanos, G., Bourne, S., ... & Martindale, C. (2011). Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells. *Neuro-oncology*, 13(5), 487-499.

Nagathihalli, N. S., & Nagaraju, G. (2011). RAD51 as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(2), 209-218.

Hansen, L. T., Lundin, C., Spang-Thomsen, M., Petersen, L. N., & Helleday, T. (2003). The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *International journal of cancer*, 105(4), 472-479.

Hwang, J. T., Kwak, D. W., Lin, S. K., Kim, H. M., Kim, Y. M., & Park, O. J. (2007). Resveratrol induces apoptosis in chemoresistant cancer cells via modulation of AMPK signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095(1), 441-448.

Tennstedt, P., Fresow, R., Simon, R., Marx, A., Terracciano, L., Petersen, C., ... & Borgmann, K. (2013). RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *International journal of cancer*, 132(9), 2118-2126.

Hine, C. M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20810-20815.

Hine, C. M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2012). Rad51 promoter-targeted gene therapy is effective for in vivo visualization and treatment of cancer. *Molecular Therapy*, 20(2), 347-355.

Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., A Tomas-Barberan, F., Teresa Garcia-Conesa, M., & Carlos Espin, J. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Current pharmaceutical design*, 19(34), 6064-6093.



## 9. Apéndices

### 9.1 Detalle de procedimientos experimentales

**Muestras de pacientes.** Se utilizaron 22 biopsias frescas disponibles en el banco de tumores del laboratorio congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para el análisis de Western Blot. Se usaron 22 bloques de parafina del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Cancerología donde se llevó a cabo la investigación, se realizaron cortes de 5 micras en laminillas electrocargadas para su posterior análisis por inmunohistoquímica y su análisis histopatológico. No se colectaron muestras nuevas para la realización de este proyecto.

**Extracción de proteínas de biopsias de CaCU.** Muestras de tumores congelados fueron trituradas hasta pulverización sobre nitrógeno líquido; la extracción de proteína total se realizó con solución RIPA que contiene inhibidores de proteasas (Complete, Roche), las células son lisadas al pasarlas por jeringa de 22G y centrifugación a 12 000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación de proteínas se realizó con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific) Las proteínas se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Líneas celulares.** Se emplearon las líneas celulares HeLa y SiHa, derivadas de carcinoma cervical, con virus del papiloma humano tipo 18 y 16, respectivamente; la línea celular HaCaT son queratinocitos humanos inmortalizados no tumorigénicos y la línea celular HEK 293T, derivados de riñón embrionario humano. HeLa, SiHa y HaCaT se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO) y HEK 293T en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO) suplementados con suero bovino fetal (FBS, GIBCO) al 10%, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y bencilpenicilina 100 U/mL. Se cultivaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Los experimentos se realizaron en cultivos entre 70% y 80% de confluencia.

**Ensayo de formación de esferas.** Para obtener cultivos enriquecidos en células troncales cancerosas se sembraron células HeLa, SiHa y HaCaT en condiciones no adherentes utilizando medio MammoCult™ al 10% del suplemento respectivo (Stem Cell Technology), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina y 100 U/mL de bencilpenicilina en placas de superficie ultra-baja adherencia a una densidad de 3000 cel/mL por 7 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.

**Generación de partículas lentivirales.** Se realizó una co-transfección con los plásmidos Pax2, PDM2 y el gen de interés Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 o c-Myc en células HEK-293T. Los

virus fueron cosechados 72h post-transfección. Se alicuotaron y congelaron a -70°C hasta su utilización. Los plásmidos que se utilizaron para generar las partículas lentivirales fueron Oct4 (addgene 16579), Sox2 (16577), Nanog (16578), Klf4 (addgene 20725), c-Myc (20723), OSKM (201321), PM2G (12259), EGFP (21320), Pax2 (12260).

**Transducción de genes.** Se realizaron transducciones estables en las células HaCaT usando las partículas lentivirales que expresan las proteínas Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 o c-Myc, y que poseen un gen de resistencia a Puromicina. Se emplearon lentivirus con la proteína EGFP para poder evaluar la infectividad de las partículas virales por microscopia y citometría de flujo. Para la obtención de las clonas estables se utilizó Puromicina (GIBCO) a 285 ng/mL por 30 días para la selección.

**RT-qPCR.** Se hicieron ensayos de transcriptasa reversa-PCR cuantitativa (RT-qPCR) para evaluar los niveles de RNA mensajero de Oct4, Sox2 y Nanog en cultivos de esferas de HeLa y SiHa y en su contraparte en monocapa. La extracción del RNA total se realizó empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La calidad y la cuantificación del RNA se determinó usando el equipo Epoch™ BioTek. El RNA se digirió con DNAsa I (Biolabs) y se usó para la síntesis de cDNA con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen). La RT-qPCR se realizó añadiendo 500 ng de cDNA, 10 µL de SYBR Green, 100 ng de Oligo y agua hasta un volumen final de 20 µL. Utilizamos el software StatMiner™ Real-Time para obtener los resultados, el análisis estadístico se realizó por el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El gen de  $\beta$ -Actina se usó como control interno.

**Western Blot.** Se separaron 60 µg de proteína total en un gel SDS - PAGE al 10% según procedimientos estándar y la transferencia se realizó en membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Thermo Scientific) y la membrana se bloqueó con leche baja en grasa al 5% por 1h. Posteriormente, las membranas se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios anti-Oct4 (sc-5279), anti-Sox2 (sc-38408), anti- Nanog (sc-376915), anti- KLF4 (P01-MA515672) y anti-c-Myc (sc-40). Las membranas se lavaron con TBS-Tween 20 y se incubaron con anticuerpo secundario anti-mouse. Como control de carga se empleó el anticuerpo policlonal de cabra  $\beta$ -actina (sc-1616). Para la detección del complejo proteína-anticuerpo se utilizó Immobilon Western Chemiluninescent HRP Substrato (Millipore) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para la segunda parte de la tesis las membranas fueron incubadas con el anticuerpo contra RAD51 (Abcam), como control de carga se empleo  $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology).

**Formación de tumores en ratones.** Se emplearon ratones inmunodeficientes nu/nu hembras de 4 a 6 semanas de edad. Células HaCaT que fueron transducidas con Oct4, Sox2, Nanog, KLF4 o c-Myc para inducir capacidad tumorigénica, se inocularon  $6 \times 10^6$  células por vía subcutánea en uno de los costados inferiores de un grupo de 6 ratones para evaluar si adquirieron la capacidad de formar tumor. A un segundo grupo de 6 ratones, 4 se inocularon con  $6 \times 10^6$  y 2 con  $8 \times 10^6$  células HaCaT no transducidas. Un tercer grupo de 6 ratones fueron inoculados con  $2 \times 10^6$  células HeLa. Como vehículo, en la inoculación, se empleó medio DMEM sin suero ni antibióticos en un volumen de hasta 200  $\mu$ L. Se siguió el crecimiento tumoral por cuatro semanas para HeLa y por siete semanas para HaCaT. Se realizó la eutanasia del ratón en una cámara de CO<sub>2</sub>.

**Inmunohistoquímica.** Se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu$ m de bloques en parafina de muestras de pacientes con CaCU. Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina para confirmar el diagnóstico histopatológico, así como para contrastar tinciones con Oct4, Sox2, Nanog, KLF4, c-Myc y p16. La inmunohistoquímica se realizó en el equipo automatizado Ventana.

**Análisis estadístico.** Los datos cuantitativos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar, los datos cualitativos se expresan como porcentaje o en proporción. Se realizó la prueba F de Fisher exacta para evaluar la significancia de la correlación entre la expresión de cada uno de los genes Oct4, Sox2, Nanog, Klf4, c-Myc con la histopatología, así como con la respuesta clínica de las pacientes. Se consideró que existe diferencia estadísticamente significativa cuando los Valores de P obtenidos en los análisis fueron menores a 0.05. Se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism v6 para Windows.

**Exposición a fármacos.** Etopósido (VP16). Las células se trataron con VP16 para causar rupturas de cadena doble en el ADN. La concentración empleada fue la concentración inhibitoria media (CI50) de 5.8  $\mu$ g/mL. El fármaco se adicionó al cultivo, se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de agregar VP16 a las esferas, los aglomerados se disgregaron mecánicamente en la misma caja de cultivo.

**Resveratrol (RES).** Los cultivos fueron expuestos RES para causar daño genotóxico e inhibir la expresión de RAD51. La concentración empleada fue la concentración inhibitoria media (CI50) de 31.35  $\mu$ g/mL. El fármaco es adicionado al cultivo, se incuban durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de agregar RES a las esferas, los aglomerados son disgregados mecánicamente en la misma caja de cultivo. Para retirar el fármaco el medio es

extraído del cultivo, se realizan dos lavados con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) y se adiciona medio nuevo. Los cultivos son nuevamente incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> el tiempo necesario hasta su empleo para el siguiente ensayo correspondiente.

**Ensayo de eficiencia de formación de esferas.** Las esferas fueron disociadas con solución de EDTA 1.0 mM y tamizadas en malla celular de nylon de 40 µm, visualmente se verificó la ausencia de conglomerados celulares. Se sembraron cien células por pozo en placas de 96 pozos con 200 µl de medio. Cada dos días se adicionaron 25 µl de medio nuevo por pozo. El conteo de esferas en cada pozo se realizó 7 días después de la siembra. La eficiencia de formación de esferas se calculó como el número de esferas formadas, dividido por el número inicial de células sembradas y expresado como porcentaje.[19] El cálculo se realizó desde la primera hasta la quinta generación en las cuatro líneas celulares.

**Silenciamiento de RAD51 con siRNAs.** En placas de 6 pozos con baja adherencia fueron inoculadas 200,000 células individuales de HeLa Esferas en 2.5 mL de MammoCult suplementado. A las 24 horas fueron transfectadas con 5, 10, 20 y 30 nM de siRNAs usando siPORT agent transfection (Applied Biosystems), 72 horas después de la transfección, se evaluó la viabilidad celular, la inducción de la apoptosis y el silenciamiento de la proteína RAD51.

**Viabilidad celular por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).** Los cultivos expuestos a las condiciones ya indicadas se sembraron a 5000 células por pozo en placa de 96 pozos y transcurrido el tiempo indicado la viabilidad fue evaluada añadiendo a cada pozo 50 µL de solución MTT (Sigma) a 5 mg/mL, se incubó por 2 a 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se extrae el líquido de cada pozo, se agregan 50 µL de DMSO y se permite la disolución durante 10 minutos a temperatura ambiente del precipitado formado, se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de ELISA a 570 nm.

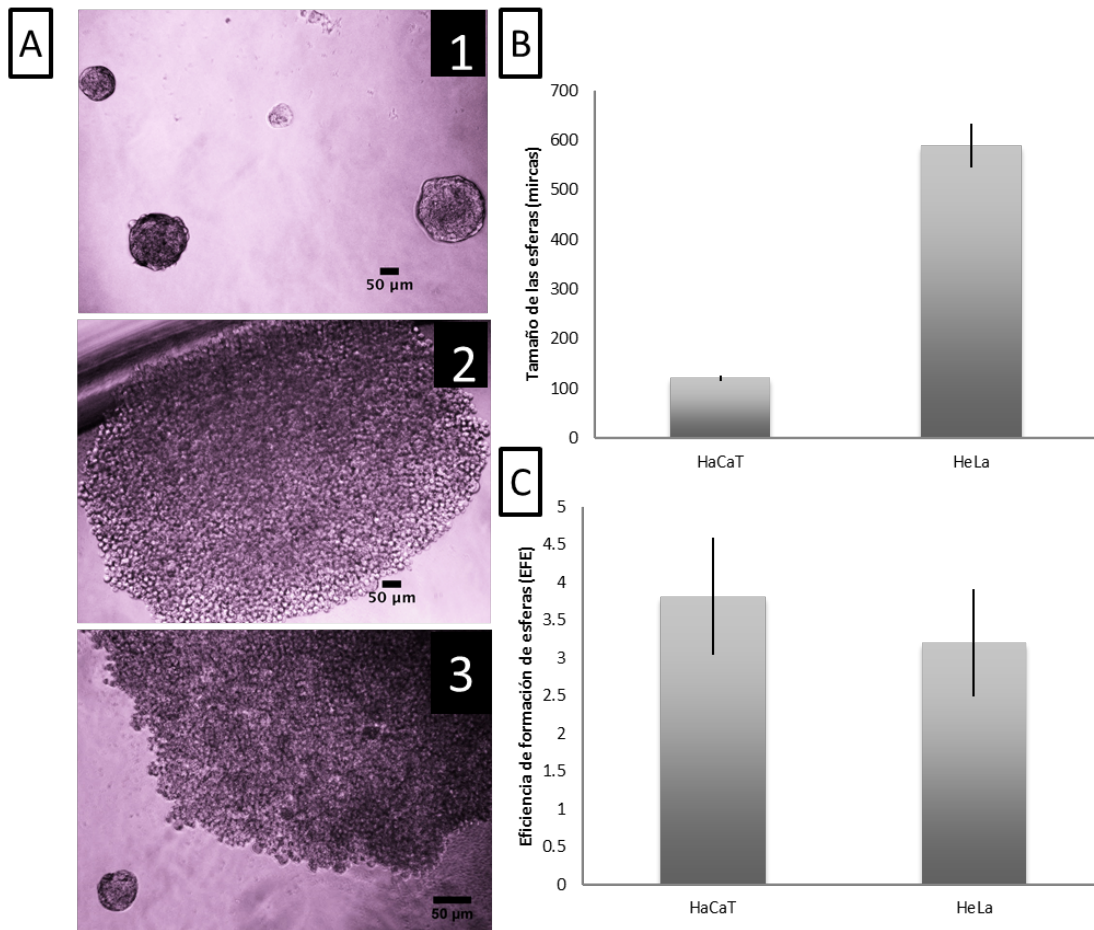
**Ciclo celular.** Los cultivos celulares después de exponerlos a las condiciones ya mencionadas fueron suspendidos en PBS, el cultivo adherente fue cosechado mediante tripsina y el cultivo en esferas fue disgregado mecánicamente. Las células resuspendidas fueron fijadas mediante la adición lenta de etanol al 80% frío a la suspensión. Se almacenaron a -20°C hasta su lectura por citometría de flujo con la técnica de Ioduro de Propidio/RNAsa.

**Apoptosis.** Los cultivos celulares después de exponerlos a las condiciones ya mencionadas fueron resuspendidos en PBS. En esta ocasión el cultivo adherente fue cosechado mediante

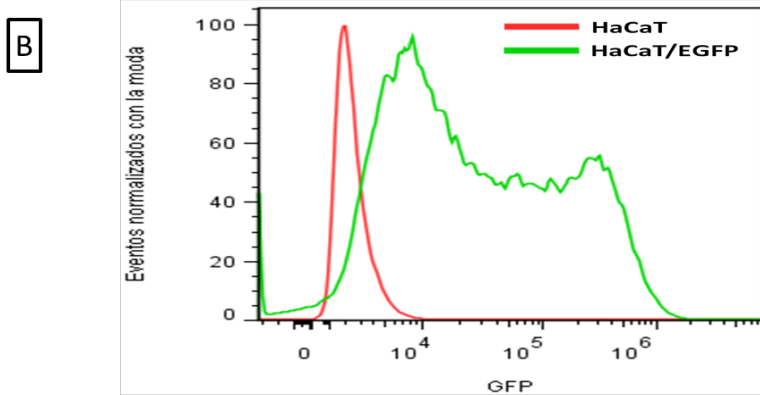
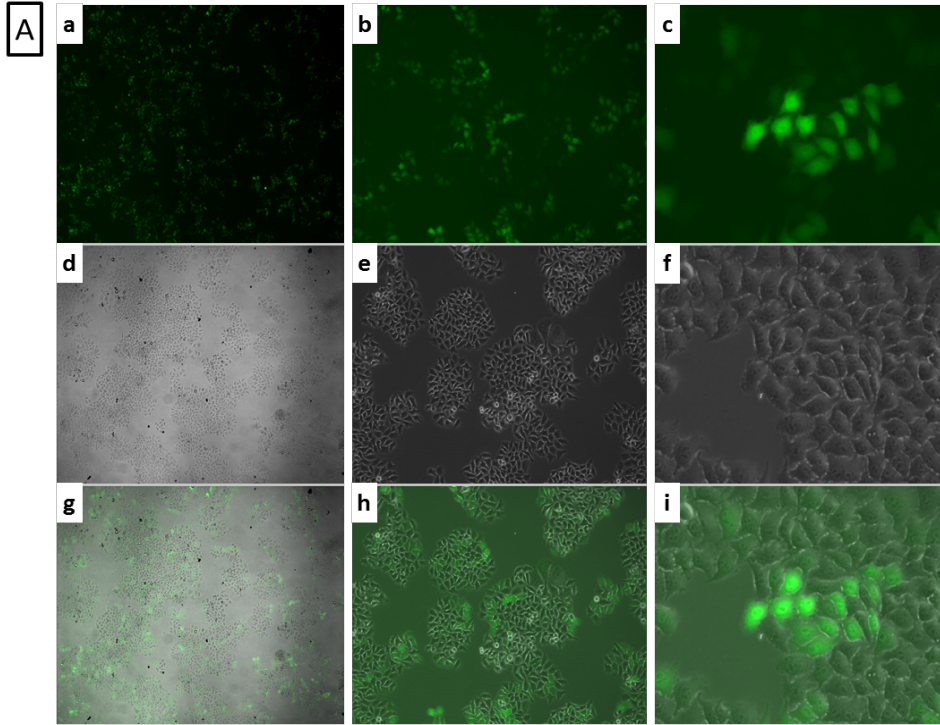
Verseno, el cultivo en esferas continuo siendo disgregado mecánicamente. La evaluación de la apoptosis se realizó empleando el set de reactivos Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich), la lectura se realizó mediante citometría de flujo.

**Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo.** Un millón de células fueron incubadas durante 10 min a 4°C con el reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi Biotec), seguido del marcaje con los anticuerpos monoclonales anti-CD34 (AC136, 1:11 dilución, Miltenyi Biotec), -CD49f (GoH3, 01:11 dilución, Becton Dickinson) y -CD133 (AC133/1, 1:11 dilución, Miltenyi Biotec). Después de 15 min a 4°C, las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS frío y resuspendidas en 0,5 mg/ml de Yoduro de Propidio durante 10 min a temperatura ambiente. En el análisis por citometría de flujo se empleó el equipo FACS Calibur (BD Biosciences, CA, EE.UU.) y el programa Cell Quest Pro (BD Biosciences, CA, EE.UU.). La fluorescencia de fondo se estableció empleando anticuerpos de isotipo conjugados a fluorocromos de la misma casa comercial. Poblaciones celulares enriquecidas con células troncales hematopoyéticas provenientes de sangre de cordón umbilical se emplearon como controles positivos para CD133 y CD34, y leucocitos de sangre periférica humana para CD49f.

## 9.2 Figuras suplementarias



**Figura S1. HaCaT forma esferas con baja eficiencia.** Mediante el ensayo de formación de esferas en condiciones no adherentes tanto las esferas formadas por HeLa (A1) como las formadas por HaCaT (A2) difieren en tamaño (A3, B). La eficiencia de formación de esferas es similar. Experimentos por triplicado y se muestra el promedio  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura S2. Lentivirus infectivos para HeLa y HaCaT.** Se infectó a HeLa y a HaCaT con partículas lentivirales que expresan EGPF, se evaluó la infectividad en HeLa por microscopia y en HaCaT por citometría de flujo. Filtro para EGFP (Aa, Ab, Ac), campo claro (Ad, Ae, Af) y las imágenes superpuestas (Ag, Ah, Ai). Por citometría de flujo detectamos que el 80 % de las células HaCaT transducidas son EGFP positivas.