



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Características Diferenciales de Células Troncales Cancerosas Dentro de
Subpoblaciones CD44std y CD44v9 y su Respuesta ante Alteraciones Inducidas
por TGF- β en el Carcinoma Hepatocelular”**

TESIS

Que Presenta

M. en C. MARIO ALEJANDRO AGUILAR CHAPARRO

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis:

Dr. Saúl Villa Treviño

Ciudad de México

Diciembre, 2023

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Carcinogénesis Experimental (Lab 50) del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Investigador Emérito Dr. Saúl Villa Treviño. Para el desarrollo de este proyecto se obtuvo la beca de Doctorado # (CVU:706366) durante el periodo 2017-2021 que otorga el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) bajo la convocatoria de becas Nacionales a estudiantes inscritos en Programas de Posgrado de Calidad (PNPC).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Saúl Villa Treviño por permitirme ser parte de su laboratorio y compartirme sus experiencias y enseñanzas. A la Dra. Carolina Piña Vázquez, gracias por todo el apoyo, así como sus conocimientos y consejos, además de su infinita paciencia conmigo. A mis asesores el Dr. José Manuel Hernández Hernández, Dr. José de Jesús Serrano Luna, Dr. José Efraín Garrido Guerrero, Dr. Jaime Arellanes Robledo y Dr. Sergio Juárez Méndez por sus comentarios y correcciones oportunas a esta tesis. A mis amigos y compañeros de laboratorio 50, Andy, Hury, There y Mony por hacer de mi estancia una experiencia, enseñanza y amistades muy agradables. Al personal del laboratorio 50, muchas gracias por apoyarme en la asistencia técnica Vic, Eunice, Alejandro y Sergio. A Clara, por su eficiente labor secretarial y con mucha paciencia ante sus indicaciones y sugerencias. A los integrantes del Laboratorio 52 por sus consejos y amistad, Citlali, Chris, Carlos, Delfino y Magda. Al personal de la Unidad de Producción y Experimentación en Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV, a Benjamín por su asistencia en el cuidado de los animales de experimentación y por su disponibilidad. Al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) y a Víctor, encargado de la Unidad de Citometría de Flujo por sus enseñanzas y asesoría en la técnica de citometría. A mis amigos fuera del laboratorio, son incontables las pláticas de pasillo, las risas, los comentarios y palabras de apoyo que me han brindado esas personas. Muchas gracias a todas esas personas

A mis padres y familiares, Dora María y Mario, gracias por ser las maravillosas personas que forman los pilares de mi vida. Quienes, gracias a su amor, cariño y apoyo incondicional, he alcanzado uno de los logros más importantes en mi vida. Q. E. P. D, espero siempre mantenerte orgulloso Papá este trabajo y todo lo que haga va por ti. A mis hermanos, Esthela y Diego, gracias por siempre mantenerse tan fraternales siempre sin importar las adversidades y brindándome apoyo incondicional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLA	9
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
Células Troncales Cancerosas	16
Marcadores de CSC	21
Aislamiento y evaluación funcional de las CSC.....	25
Ensayo de clonogenicidad.	25
Ensayo de esferoides.	25
Estructura genómica.....	28
Estructura proteica de CD44.....	30
CD44 como marcador de CSC	33
Papel crucial de las isoformas de CD44 en cáncer y uso como marcadores de CSC	36
Isoformas de CD44 en cáncer y su relación con TGF- β	41
2. ANTECEDENTES.....	44
Isoformas de CD44 en el carcinoma hepatocelular y su relación con TGF- β	44
3. JUSTIFICACIÓN.....	46
4. HIPÓTESIS	47
5. OBJETIVO.....	47
Particulares.....	47
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
6.1. Análisis de datos transcriptómicos.....	48

6.2.	Líneas celulares	48
6.3.	Disgregación celular	49
6.4.	Citometría de flujo.....	49
6.5.	Inmunocitoquímica.....	49
6.6.	Separación celular magnética activada (MACS)	50
6.7.	Índice de área celular	50
6.8.	Western Blot.....	50
6.9.	Ensayo de clonogenicidad.....	51
6.10.	Ensayo de formación de esferoides	51
6.11.	Modelos animales	52
6.11.1.	Ensayo de xenotrasplante subcutáneo.....	52
6.11.2.	Ensayo de xenotrasplante ortotópico.....	52
6.11.3.	Ensayo de inyección por vena de la cola.....	53
6.12.	Ensayo de adhesión.....	53
6.13.	Ensayo de migración por cicatrización de herida.....	53
6.14.	Ensayo de invasión en cámara Transwell	54
6.15.	Tratamiento con TGF- β	54
6.16.	Preparación de muestras para espectrometría de masas	54
6.17.	Análisis por espectrometría de masas DIA Label-Free.....	55
6.18.	Análisis bioinformático.....	56
6.19.	Análisis estadístico.....	57
7.	RESULTADOS	58
7.1.	Validación de CD44v8-10 como Marcadores en HCC, a Diferencia de CD44std... 58	
7.2	Identificación de CD44std y CD44v9 en la Línea Celular SNU-423	60
7.3.	Purificación de Isoformas CD44v9- y CD44v9+ en Células SNU-423.....	62
7.4.	Expresión de Factores de Transcripción de CSC y Características de Formación de Colonias y Esferoides en las Células SNU-423, CD44std y CD44v9.	64

7.5. Características de Migración, Invasión y Adhesión en Células CD44std y CD44v9 en Comparación con las Células SNU-423	66
7.6. TGF- β Induce Cambios Morfológicos con la Expresión de CD44std y Disminución de CD44v9	68
7.7. TGF- β Intercambia los Rasgos de CSC (Clonogenicidad y Esferoides) en CD44std y CD44v9	70
7.8. TGF- β Potencia el Fenotipo Mesenquimal, Invasión y Migración (CD44std) y Adhesión (CD44v9).....	72
7.9. Análisis Proteómico de la Regulación de CD44std y CD44v9 en Diferentes Vías Biológicas.....	74
7.10. TGF- β Genera una Señalización Diferencial en la Vía de MAPK de CD44std y CD44v9	77
7.11. Validación de la Vía de Señalización Diferencial en la Vía de MAPK en CD44std y CD44v9 Posterior a TGF- β	80
8. DISCUSIÓN.....	82
9. CONCLUSIONES	92
10. PERSPECTIVAS.....	93
12. ANEXOS	94
14.REFERENCIAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Origen y características de las CSC.	20
Figura 2. Identificación, aislamiento y caracterización de CSC.	27
Figura 3. Estructura genómica y codificación de <i>cd44</i>.	29
Figura 4. Estructura proteica, señalización y función de CD44.	32
Figura 5. Función de isoformas de CD44 en el cáncer.	39
Figura 6. Expresión de CD44 total, sus exones e isoformas en datos de cáncer de hígado en TCGA.	60
Figura 7. Expresión de CD44 y sus isoformas en líneas celulares de HCC.	62
Figura 8. Validación de la purificación de CD44v9- y CD44v9+ en células SNU-423.	64
Figura 9. Expresión de factores de transcripción CSC y evaluación de la formación de colonias y esferoides en células SNU-423, sus subpoblaciones CD44std y CD44v9.	66
Figura 10. Expresión de marcadores EMT y evaluación de migración, invasión y adhesión en células SNU-423, sus subpoblaciones CD44std y CD44v9.	68
Figura 11. Efecto de TGF-β sobre modificaciones morfológicas y cambios de expresión CD44std y CD44v9 en subpoblaciones.	70

<u>Figura 12. Efecto de TGF-β sobre la expresión de factores de transcripción CSC y evaluación de la formación de colonias y esferoides en células SNU-423, sus subpoblaciones CD44std y CD44v9.....</u>	72
<u>Figura 13. Efecto de TGF-β sobre Expresión de marcadores EMT y evaluación de migración, invasión y adhesión en células SNU-423, sus subpoblaciones CD44std y CD44v9.....</u>	74
<u>Figura 14. Reactome pathways en CD44std y CD44v9 posterior a TGF-β..</u>	77
<u>Figura 15. Análisis proteómico sobre la señalización de CD44std y CD44v9 posterior al tratamiento TGF-β.....</u>	80
<u>Figura 16. Validación de la señalización diferencial en MAPK en CD44std y CD44v9 posterior a TGF-β.....</u>	82

ÍNDICE DE TABLA

	Pagina
<u>Tabla 1. Marcadores de CSC en diferentes tipos de cáncer.</u>	24
<u>Tabla 2. CD44 como marcador de CSC en diferentes tipos de cáncer.</u>	35
<u>Tabla 3. Funciones de CSC en diferentes isoformas de CD44.</u>	41
<u>Tabla 4. Cambios de isoformas de CD44</u> <u>en diferentes tipos de cáncer por TGF-β.</u>	44

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Abreviatura	Definition	Definición
HCC	Hepatocellular Carcinoma	Carcinoma Hepatocelular
CSC	Cancer Stem Cell	Células Troncales Cancerosas
EMT	Epitheilal Mesenchymal Transition	Transición Epitelio Mesénquima
TGF- β	Transforming Grown Factor – Beta	Factor de Crecimiento Transformante Beta
NCSC	Non cancer stem cell	Células No Troncales del Cáncer
ROS	Reactive Oxigen Species	Especies Reactivas de Oxígeno
HA	Hyaluronic acid	Ácido Hialurónico
PCR	Polimerase chain reaction	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ALDH	Aldehyde dehydrogenase	Aldehído Deshidrogenasa
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Separación Celular Activada por Fluorescencia
MACS	Magnetic-activated cell sorting	Separación Celular Activada por Magnetismo
ESRP	Epithelial splicing regulatory proteins	Proteínas Reguladoras del Empalme Epitelial
DE	Extracelular Domain	Dominio Extracelular
DT	Stem Domain	Domino Troncal
DC	Citoplasmatic Domain	Dominio Citoplasmático
ERM	Ezrin, Radixin, Myosin	Ezrina, Radixina, Miosina
TKR	Tyrosine Kinase Receptor	Receptor de Tirosina Cinasas
EGFR	Epithelial Grown Factor Receptor	Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial
EGF	Epithelial Grown Factor	Factor de Crecimiento Epitelial
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	Proteína de Unión Múltiple 1
LIHC	Liver Hepatocelular Carcinoma	Carcinoma Hepatocelular de Hígado

RPKM	Reads Per Kilobase Million	Lecturas Por Kilobase de Millón
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium	Medio Modificado de Dulbecco Eagle
FBS	Fetal Bovine Serum	Suero Fetal Bovino
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	Instituto Conmemorativo del Parque Roswell
EDTA	Ethylene diamine tetra-actic acid	Ácido etilendiaminotetraacético
PBS	Phosphate Buffered Saline	Buffer Salino de Fosfatos
mL	Mililiter	Mililitro
min	Minute	Minuto
Rpm	Revolution per minute	Revolución por minuto
BSA	Bovine Seric Albumin	Albúmina Sérica Bovina
H ₂ O MQ	Mili Q wáter	Agua Mili Q
h	Hour	Hora
µg	Micrograms	Microgramos
hrEGF	Recombinant hormone Epithelilal Grown Factor	Hormona Recombinante del Factor de Crecimiento Epidermal
hrFGF	Recombiant hormone Fibroblast Grown Factor	Hormona Recombinante del Factor de Crecimiento de Fibroblasto
GO	Gene Onotology	Ontología de Gen
FDR	False Discovery Rate	Índice de Descubrimiento Falso
ANOVA	Analysis of Variance	Análisis de la Varianza
Mm	Milimeters	Milímetros
µm	Micrometers	Micrómetros

RESUMEN

Se ha propuesto que las isoformas de CD44 pueden servir como marcadores para identificar células troncales cancerosas (CSC) en el carcinoma hepatocelular (HCC). Una característica distintiva de las CSC es su capacidad de experimentar una transición epitelio mesénquima (EMT), la cual puede ser inducida por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). No obstante, aún no se han definido por completo los rasgos de las CSC en relación con las isoformas de CD44 ni tampoco los efectos de TGF- β en los rasgos de las CSC presentes en las subpoblaciones que expresan isoformas de CD44 en el HCC. El objetivo de este trabajo fue determinar los rasgos de las CSC en las células que expresan las isoformas de CD44 y analizar los cambios inducidos por el TGF- β . Mediante el análisis de datos transcriptómicos en pacientes con HCC, se identificó a CD44v8-10 como un posible marcador del HCC. En las células SNU-423, se detectó que el 99 % de la población, expresaba el CD44 y se identificaron dos isoformas de CD44, CD44std y CD44v9. Se obtuvieron subpoblaciones de CD44, mediante purificación de perlas magnéticas, las cuales consistieron en células CD44v9+ (CD44v9) y CD44v9- (CD44std). Se observó que las células CD44v9 mostraron un mayor potencial en la formación de colonias, esferoides y adhesión, mientras, que las células CD44std demostraron capacidades significativas de migración e invasión. Además, durante el proceso de EMT inducido por TGF- β , se produjo un cambio en los rasgos de formación de colonias y esferoides entre las células CD44std y CD44v9, y como resultado las funciones migratorias, invasivas y adhesivas mejoraron. El análisis proteómico y la validación de la señalización de MAPK, revelaron que esta vía se activa en células CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β . Estos hallazgos demuestran que CD44std y CD44v9 modifican los rasgos de CSC en respuesta a TGF- β , a través de diversas vías de señalización, incluyeron MAPK, lo cual contribuye al desarrollo del HCC.

“Differential Characteristics of Cancer Stem Cells within CD44^{std} and CD44^{v9} Subpopulations and Their Response to TGF- β -Induced Alterations in Hepatocellular Carcinoma”

ABSTRACT

It has been proposed that CD44 isoforms can serve as markers to identify cancer stem cells (CSC) in hepatocellular carcinoma (HCC). A distinctive feature of CSC is their ability to undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT), which can be induced by transforming growth factor-beta (TGF- β). However, the characteristics of CSC in relation to CD44 isoforms have not been fully defined, nor have the effects of TGF- β on the traits of CSC present in subpopulations expressing CD44 isoforms in HCC. The aim of this study was to determine the traits of CSC in cells expressing CD44 isoforms and analyze the changes induced by TGF- β . Through transcriptomic analysis in HCC patients, CD44^{v8-10} was identified as a potential marker for HCC. In SNU-423 cells, it was found that 99% of the population expressed CD44, and two CD44 isoforms, CD44^{std} and CD44^{v9}, were identified. CD44 subpopulations were obtained through magnetic bead purification, consisting of CD44^{v9+} (CD44^{v9}) and CD44^{v9-} (CD44^{std}) cells. CD44^{v9} cells showed greater potential in colony formation, spheroid formation, and adhesion, while CD44^{std} cells demonstrated significant migration and invasion capabilities. Additionally, during the TGF- β -induced EMT process, there was a change in colony and spheroid formation traits between CD44^{std} and CD44^{v9} cells, resulting in improved migratory, invasive, and adhesive functions. Proteomic analysis and MAPK signaling validation revealed that this pathway is activated in CD44^{std} and CD44^{v9} cells after treatment with TGF- β . These findings demonstrate that CD44^{std} and CD44^{v9} modify CSC traits in response to TGF- β through various signaling pathways, including MAPK, contributing to the development of HCC.

1. INTRODUCCIÓN

En los seres vivos, varios tejidos llevan a cabo un recambio celular continuo y rápido. A pesar de esta dinámica, los componentes celulares mantienen una masa y arquitectura equilibrada en el tiempo, gracias a un proceso cuidadosamente regulado por una población minoritaria de células de larga vida, conocidas como “células madre” o en inglés: “stem cells”. Estas células “stem cells” se caracterizan por tres propiedades: fundamentales, la diferenciación, la autorenovación y el control homeostático [1, 2]. De la misma forma como ocurre en los tejidos normales, los tumores están compuestos por células cancerosas que exhiben una diversidad de estados fenotípicos distintos con diferentes capacidades funcionales relacionadas con el mantenimiento tumoral [3, 4]. Dentro de esta heterogeneidad tumoral, se encuentra una subpoblación conocida en inglés como “*cancer stem cells*”, y la traducción literal al español las refiere como “*células madre cancerosas*”. La palabra “*madre*” relativo a las células, de acuerdo con la Real Academia Española (RAE), tiene como definición: *célula que se reproduce dando lugar a dos o más células hijas*. Esta definición es insuficiente ya que limita las capacidades funcionales a la capacidad de división asimétrica de las “*cancer stem cells*”. Por otro lado, la palabra “*troncal*” relativo a las células, se define como: *célula indiferenciada que puede dar lugar a distintos tipos de tejidos* [5]. Por lo que, la palabra “*troncal*” abarca términos más adecuados, no tan comprometidos y en contexto con las características de las “*cancer stem cells*”. Debido a lo anterior, utilizaremos en este trabajo el termino de Células Troncales Cancerosas (CSC) en lugar de células madre cancerosas.

La idea de nombrarlas como CSC fue propuesta por Rudolph Virchow en 1855 a través de la hipótesis de que los tumores se originan a partir de restos embrionarios, debido a las similitudes entre los tumores y tejidos embrionarios [6]. Esta teoría propuesta por Virchow fue después fue ampliada y desarrollada a lo largo de los años. La descripción de CSC por primera vez en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) se atribuye a Bonnet y Dick en 1994-1997. Su estudio demostró que

en la sangre periférica de pacientes con LMA, una subpoblación CD34⁺/CD38⁻ constituían aproximadamente 0.1-1% de las células totales y poseía una gran capacidad de formación de colonias, además de replicar varios de los aspectos de la LMA humana en ratones inmunodeficientes (SCID) [2, 7]. Posteriormente, en 2001 se introdujo por primera vez el término de CSC [8]. Estudios posteriores, llevaron a analizar propiedades funcionales en las CSC, como la resistencia a quimioterapias y radiación, además de un aumento en el potencial metastásico en diferentes tipos de tumores [9]. Como resultado, han surgido estudios dedicados a la identificación de las CSC, la evaluación de sus funciones y el desarrollo de terapias dirigidas contra ellas.

Células Troncales Cancerosas

Las CSC se definen operativamente como subpoblaciones heterogéneas con una organización jerárquica en un tumor. A pesar de que el origen de las CSC sigue siendo desconocido, varios autores han propuesto varias hipótesis diferentes acerca de sus orígenes partiendo de células troncales normales, células progenitoras o células diferenciadas [8, 10]. Cualquiera de estos escenarios es plausible, dado a que la contribución del contexto celular puede depender de factores individuales o combinatorios, así como de la influencia del microambiente y de los mutágenos involucrados [11]. Las CSC se caracterizan principalmente por sus propiedades de autorenovación, diferenciación e inicio y mantenimiento tumoral. Además, se les ha atribuido una serie de características adicionales que desempeñan un papel crucial en la progresión del cáncer, lo cual incluye la plasticidad celular, la supresión del sistema inmune, la evasión a la apoptosis, la resistencia a terapias y la capacidad de metastatizar [12]. Para cada una de sus características se ha descrito lo siguiente (**Figura 1**):

Autorenovación y diferenciación. La habilidad de autorenovación y formación de nuevas CSC, mediante la división simétrica permite el mantenimiento de las CSC. La diferenciación es mediada por la división asimétrica con la capacidad de generar las CSC y las Células No Troncales del Cáncer (NCSC). Estos conceptos, se basan en que no todas las células tumorales en el cáncer son iguales [13], los tumores están conformados por fracciones de células tumorales con diferentes cantidades de CSC y NCSC. Las subpoblaciones de CSC pueden ser trasplantadas durante múltiples generaciones, lo cual indica su capacidad de autorenovación y diferenciación [10].

Inicio y mantenimiento tumoral. Esta característica es fundamental para identificar a una verdadera CSC. Solo las CSC pueden iniciar un desarrollo tumoral al ser trasplantadas en ratones inmunodeficientes de manera repetida. La heterogeneidad del tejido tumoral coloca a las CSC como subpoblaciones en la cima de la jerarquía organizativa del tumor, seguido de las NCSC, que se

consideran la mayoría en términos de composición celular dentro del tumor. Estas CSC y NCSC subsisten en un nicho o microambiente tumoral, que consiste en una compleja red de diversas células. Este nicho desempeña un papel crucial al mantener una señalización continua con la matriz extracelular para favorecer el desarrollo tumoral [14, 15].

Plasticidad celular. La plasticidad celular es un fenómeno fundamental en el microambiente tumoral en el que, las CSC mantienen una delicada armonía dinámica entre su estado de CSC y su capacidad de diferenciación hacia NCSC. Este equilibrio se encuentra parcialmente bajo el control de su tasa de diferenciación y autorenovación que involucra tanto divisiones simétricas como asimétricas [1, 2]. Se ha encontrado que cuando el nicho tumoral enfrenta estrés debido a cambios transcripcionales, epigenéticos o externos por agentes disruptivos, se desencadena un proceso de plasticidad celular entre las poblaciones NCSC y CSC [9, 16]. Por lo tanto, las NCSC pueden desdiferenciarse para adquirir características parecidas a las CSC y ser reprogramadas con un comportamiento más agresivo en el tumor [1].

Supresión del sistema inmune. Las CSC poseen una actividad distintiva para suprimir el sistema inmunológico que les otorga una ventaja en términos de supervivencia. Las CSC evaden las respuestas inmunológicas del huésped, adaptado a la dinámica del microambiente alterado por la radiación y quimioterapia [17]. Para lograr esto, las CSC secretan diversas citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β , que promueven la inmunosupresión al desregular el complejo mayor de histocompatibilidad en las células T, las células presentadoras de antígeno y las células NK [9].

Evasión a la apoptosis. La evasión de la apoptosis es esencial para la supervivencia de las CSC. Estas células mantienen una deficiencia en la señalización de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Varios mecanismos contribuyen a la supervivencia apoptótica de las CSC, e incluyen la desregulación de receptores de muerte y el aumento en la expresión de proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL así como inhibidores de la apoptosis (XIAP, cIAP1, cIAP2,

survivina), [18]. Así mismo, las CSC pueden inducir autofagia de subpoblaciones de CSC en condiciones de baja glucosa e hipoxia, para mantener su supervivencia [19].

Resistencia a terapéuticos. Por décadas, se ha utilizado la radiación y la quimioterapia como instrumentos para disminuir y erradicar los tumores. Actualmente, se ha descrito que las CSC contienen una alta expresión de la familia de transportadores de casete unión a ATP, lo cual lleva a una quimiorresistencia intrínseca [16]. Por otro lado, la radioterapia se ha utilizado solo o en combinación con la quimioterapia o la cirugía como terapia contra el cáncer. Las CSC son consideradas virtualmente resistentes a la radioterapia [20]. Algunos estudios han asociado los mecanismos de autorenovación, alta capacidad de reparación de ADN y reducción en inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [18]. Actualmente, la terapia convencional es insuficiente, teniendo en cuenta que la mayoría de los tratamientos se centran en eliminar las células con altas tasas proliferativa como las NCSC, lo que a menudo deja a las CSC indemnes debido a su estado de quiescencia. Esto a su vez conduce a la recurrencia del tumor en los pacientes. Se han propuesto principalmente dos estrategias para la erradicación de las CSC. La primera, es la inhibición de la autorenovación y la segunda, la inducción de la diferenciación, ambas estrategias llevan a disminuir las subpoblaciones de las CSC y generar más NCSC para erradicar el tumor [16].

Metástasis. Es la habilidad distintiva de las células tumorales que les permite migrar desde el sitio inicial del cáncer y colonizar tejidos distantes e iniciar el desarrollo de un nuevo tumor. En el contexto de las CSC, este proceso está estrechamente relacionado con la transición epitelio mesénquima (EMT). En la EMT las CSC de naturaleza epitelial pierden moléculas de adhesión como uniones estrechas, desmosomas y hemidesmosomas que conducen a una pérdida de polaridad apical-basal [21]. Posteriormente, comienza una ganancia de características mesenquimales, que conlleva a una remodelación del citoesqueleto de actina en las CSC. Otorgándoles la capacidad de degradar la membrana basal

y facilita la migración activa, un proceso que se ha asociado con la autorenovación de las CSC [22]. Varios componentes relacionados con EMT como Zeb1, Twist1, Snail1, se han encontrado en las CSC con fenotipos mesenquimales y capacidad metastásica en varios tipos de tumores [23]. Es importante destacar que la transición completa a un estado mesenquimal no es necesaria para la capacidad metastásica de las CSC [24]. Actualmente, se ha descrito suficiente información sobre el concepto de las CSC, la validación de su troncalidad y marcadores que permitan identificar subpoblaciones de CSC con base a sus marcadores fenotípicos en diferentes tipos de tumores. Esto ha contribuido en gran medida a nuestra comprensión de la biología del cáncer y ha impulsado la búsqueda de terapias dirigidas específicamente a las CSC.

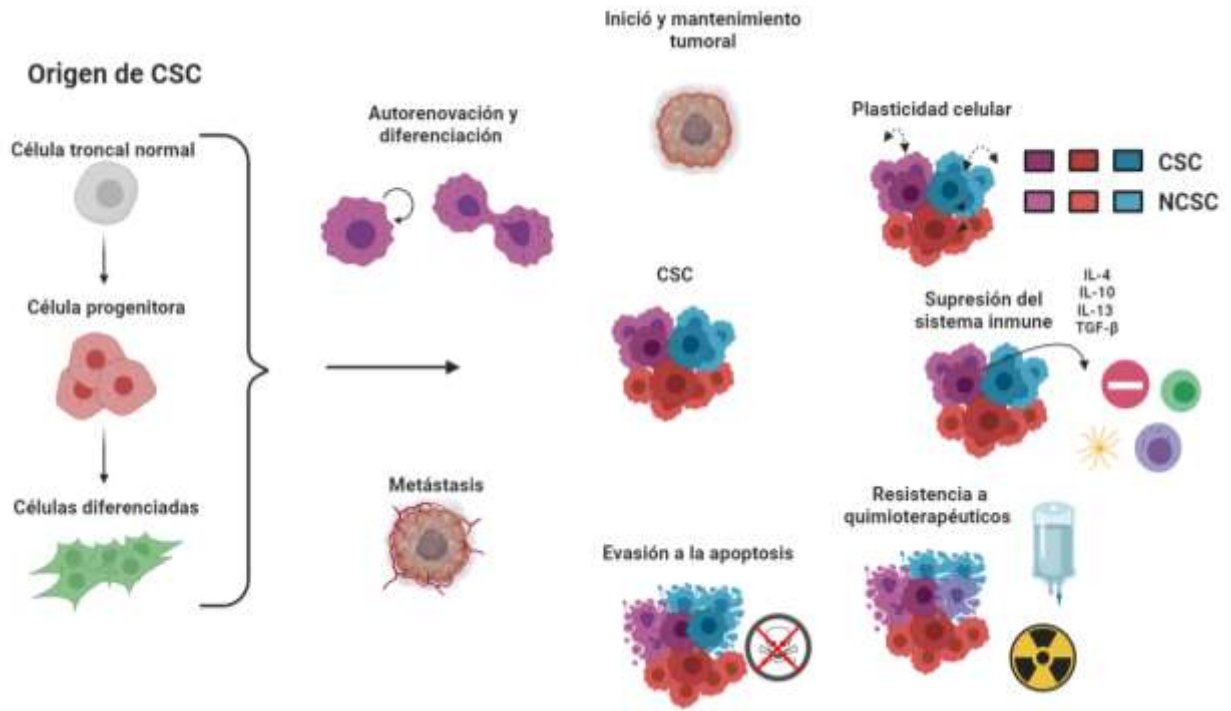


Figura 1. Origen y características de las CSC. Las CSC pueden surgir a partir de diferentes tipos de células ya sean células troncales normales, células progenitoras o incluso células completamente diferenciadas. Las subpoblaciones de CSC mantienen propiedades de autorenovación y diferenciación, inicio y mantenimiento tumoral, plasticidad celular, supresión del sistema inmune, resistencia a terapéuticos, evasión a la apoptosis y metástasis. (Hecho en BioRender: <https://biorender.com/>).

Marcadores de CSC

Los marcadores de CSC han sido objeto de estudio por varios autores y se han identificado una serie de marcadores de superficie e intracelulares para definirlos. Estos marcadores pueden ser proteínas o glicoproteínas que se encuentran sobreexpresadas, subexpresadas, mutadas o ausentes en las CSC [25]. Entre los marcadores más utilizados se encuentran los siguientes, ALDH, EpCAM, CD133, CD90, CD44, CD24 y la identificación de una población marginal [26-28]. Además, se ha llevado a cabo una evaluación a nivel molecular para detectar marcadores genéticos como *notch*, *sox2*, *musashi*, *oct4*, *nanog* y *nestina*, ampliamente relacionados con características troncales [2]. La expresión de estos marcadores se ha correlacionado con la agresividad en diferentes tipos de tumores [16, 29, 30]. Debido a estas conexiones y a las funciones para las CSC, se han propuesto el desarrollo de terapias dirigidas específicamente contra las CSC como alternativa o complemento de las terapias actuales (**Tabla 1**).

La enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), es uno de los marcadores destacados de una familia de 19 isoenzimas que desempeña un papel en la detoxificación de aldehídos en el citoplasma celular e implicada en la biosíntesis de ácido retinoico. Es considerado un marcador para CSC en diferentes tipos de tumores, debido a una alta actividad de ALDH confiere quimiorresistencia a las CSC [31].

EpCAM o CD326, este marcador se encuentra altamente expresado en carcinomas. El dominio intracelular de EpCAM puede llegar al núcleo promover la activación de β -catenina/c-Myc lo que conduce a la proliferación celular en las CSC. Además, se ha observado que su alta expresión se correlaciona con un pronóstico desfavorable en cánceres como el colorrectal, gástrico y pancreático [32].

CD133 o PROM1, es una pentaspanina, reconocida como un marcador de células troncales normales en tejidos y de CSC en tumores. Se ha asociado con la

promoción de la estabilidad del factor de HIF-1 α , así como con la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y la regulación de PI3K/Akt en CSC [33].

CD90 o THY1, la expresión de este marcador es útil para identificar a las CSC. Su interacción con diversos ligandos en el microambiente tumoral como av/ β 3, α v/ β 2, sindecano-4 y CD97 promueve la proliferación y la metástasis de las CSC. Se tiene reporte que CD90 sobreestimula la señalización de Notch, lo cual lleva a características de CSC [34, 35].

CD44 es un receptor para el ácido hialurónico (HA), que es sintetizado por CSC para atraer macrófagos asociados a tumores a sus nichos tumorales. Esto promueve la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas, con una fase proliferativa sostenida en las células tumorales [36].

CD24 es altamente expresado en las CSC, además su uso con CD44 y ALDH permite identificar CSC con características invasivas principalmente en cáncer de mama [37]. Se ha reportado que en el cáncer de hígado las CSC CD24+, regula positivamente a Nanog a través de las vías de señalización de STAT3, lo que lleva a la autorenovación y a la resistencia al tratamiento con cisplatino [38].

La “población marginal”, también conocida en inglés como “*Side population*”, se identifica como una población minoritaria, generalmente menos del 1% debido a la ausencia de fluorescencia en presencia de la tinción Hoechst 33342. Debido a la sobreexpresión de transportadores del tipo ABC, principalmente, MDR1 y ABCG2 en las CSC, lo que les permite expulsar la tinción de Hoechst 33342. Estas poblaciones marginales poseen una quimioresistencia intrínseca en las CSC [39].

Es importante destacar que, aunque estos marcadores se reconocen como indicativos de CSC, cada uno identifica subpoblaciones con características diferentes. Por ejemplo, CD133 y EpCAM identifican a una subpoblación de CSC con características epiteliales, que generan tumores rápidamente en ratones inmunodeficientes [30]. Por otro lado, CD90 y CD44 identifica a CSC con características más mesenquimales, que producen tumores pequeños, pero con una alta capacidad metastásica [40]. Por lo que, actualmente no hay un marcador

universal para identificar las CSC debido a su heterogeneidad poblacional, sino que muchos de los autores sugieren que el uso de diferentes marcadores podría ser de gran ayuda para entender el comportamiento de estas subpoblaciones en el desarrollo tumoral [14, 41, 42].

Tabla 1. Marcadores de CSC en diferentes tipos de cáncer.

Marcadores	Funciones relacionadas a CSC	Referencia
ALDH	Alta actividad asociada a quimiorresistencia	[43]
EpCAM	Potenciación de la vía Wnt/ β catenina	[44]
CD133	Inductor de la vía Wnt/ β catenina y estabilización de la vía de señalización PI3K/Akt	[33]
CD90	Sobreestimulación de la vía de Notch	[34]
CD44	Receptor de HA Correceptor de factores de crecimiento y citocinas Adhesión, migración, invasión y supervivencia celular	[45]
CD24	Regulación positiva de Nanog por STAT3 Autorenovación y resistentes a quimioterapéuticos	[38]
Población marginal	Identificación de células con una expresión elevada de transportadores del tipo ABC, relacionadas a quimiorresistencia	[46]

Aislamiento y evaluación funcional de las CSC

Actualmente las metodologías para identificar y aislar CSC se basan en los marcadores anteriormente descritos y hacen uso de técnicas y/o herramientas como la PCR, tinciones por inmunofluorescencia y citometría de flujo (**Figura 2**). La citometría de flujo permite la separación y purificación de diferentes subpoblaciones de CSC mediante la determinación de la actividad enzimática, población marginal o inmunofenotipificación, por selección celular activada por fluorescencia (FACS) o también selección celular activada por magnetismo (MACS). Las metodologías de separación y purificación celular, se basan en el uso de anticuerpos fluoromarcados o unidos a perlas magnéticas [47-49].

Una vez que se han purificado las subpoblaciones de CSC, se utilizan diversos marcadores y se procede a evaluar sus propiedades funcionales a través de una serie de ensayos. Estos ensayos evalúan propiedades clave de las CSC como la autorenovación, la diferenciación y la habilidad para mantener el crecimiento tumoral. Los diferentes ensayos para evaluar a las CSC incluyen el ensayo de clonogenicidad, esferoides, xenotrasplante o tumorigénesis en modelos inmunodeficientes de ratones.

Ensayo de clonogenicidad. Se utiliza para determinar la supervivencia celular y demuestra la capacidad de una sola célula de generar una colonia completa [50].

Ensayo de esferoides. En este ensayo las posibles CSC se cultivan en una superficie de ultra baja adherencia en un medio definido, esto pone a prueba la capacidad de las CSC de mantener un crecimiento celular (autorenovación) de manera independiente del anclaje, ambos ensayos se realizan *in vitro* [50-52].

Ensayo de tumorigénesis. Se considera el estándar de oro para identificar CSC *in vivo*, donde una vez aisladas subpoblaciones de CSC mediante citometría de flujo, son inyectadas en ratones inmunodeficientes en un rango de densidades celulares que varía desde cientos a pocos miles y deben de desarrollar tumores para ser consideradas CSC [53].

A pesar de los avances en la identificación y evaluación de las CSC, el desafío técnico por encontrar marcadores específicos para aislar o usar como blanco contra las CSC permanece en constante búsqueda. Entre los marcadores descritos, CD44 se destaca entre los otros marcadores de CSC debido a su capacidad para generar múltiples isoformas de manera específica en diferentes tipos de cáncer.

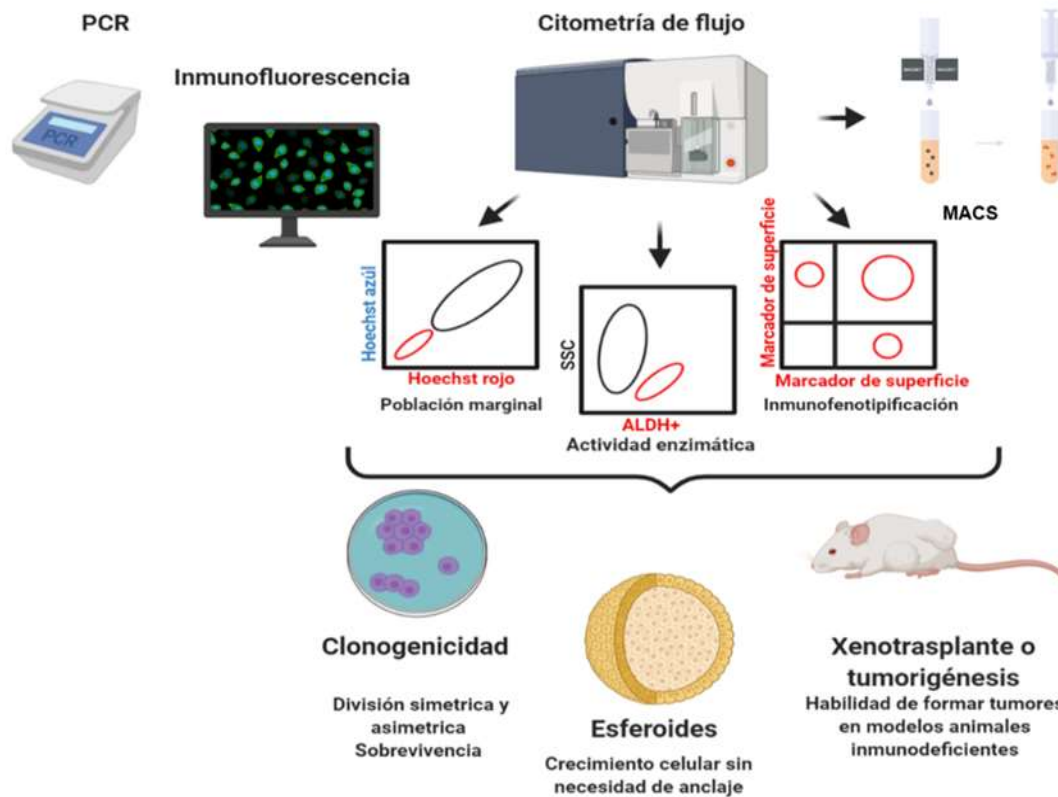


Figura 2. Identificación, aislamiento y caracterización de CSC. La identificación de marcadores de CSC, se basa en la detección de marcadores genéticos como factores de transcripción o la presencia de marcadores de superficie troncales utilizando técnicas y herramientas como PCR, inmunofluorescencia y citometría de flujo. La citometría de flujo, además de identificar marcadores específicos permite aislar subpoblaciones de CSC mediante la separación de poblaciones marginales, la evaluación de la actividad enzimática como ALDH o la inmunofenotipificación mediante FACS o MACS. Finalmente, la caracterización de las propiedades de las CSC como la autorenovación, diferenciación e inicio y mantenimiento tumoral se realiza por ensayos de clonogenicidad, esferoides y modelos de xenotrasplantes o tumorigénesis. (Elaborado en BioRender: <https://biorender.com/>).

CD44

Estructura genómica. El gen *cd44* está compuesto por 20 exones y 19 intrones localizados en el locus del cromosoma 11p13 en ser humano [54]. Estructuralmente el exón 1 codifica para la secuencia N terminal de CD44, los exones 2 y 3 determinan el sitio de unión del HA, los exones 4, 5, 16 y 17 componen la región troncal. Cabe destacar que, en esta misma región, pueden verse incluidos o no los exones 6-15 denominados exones variables (v2 - 10) por el proceso de empalme alternativo (*Alternative splicing*). El exón 18 codifica para un dominio de un pase transmembranal y el exón 20 forma el dominio citoplasmático. El exón 19 es eliminado por empalme alternativo en todas las isoformas de CD44 [55-57] (**Figura 3**).

El proceso de empalme alternativo en *cd44* no está del todo entendido. Sin embargo, se ha reportado que las proteínas reguladoras del empalme epitelial (ESRP) [58], desempeñan un papel en la inclusión de exones variantes en *cd44*. ESRP1 y ESRP2 son reguladores del empalme alternativo en células epiteliales que promueven la regulación de los exones variables (v8-10 y v6-10) en CD44 [59]. La sobreexpresión de ESRP mantiene un fenotipo epitelial que bloquea la inducción de EMT por factores como TGF- β , Twist y Snail [60-62]. También, se ha determinado que la inducción de la EMT provoca un cambio de isoforma de CD44v a CD44std por SMAD3 en la señalización de TGF- β [63]. Es importante recalcar que las isoformas generadas por *cd44* tienen pesos moleculares muy diferentes. La isoforma más pequeña, CD44 estándar (CD44std) de 85 kDa, no incluye los exones variables, mientras que las isoformas variantes CD44 (CD44v) pueden tener pesos moleculares de 100 a 250 kDa y puede incluir individualmente o en grupo los exones de v2 - 10 [64].

cd44

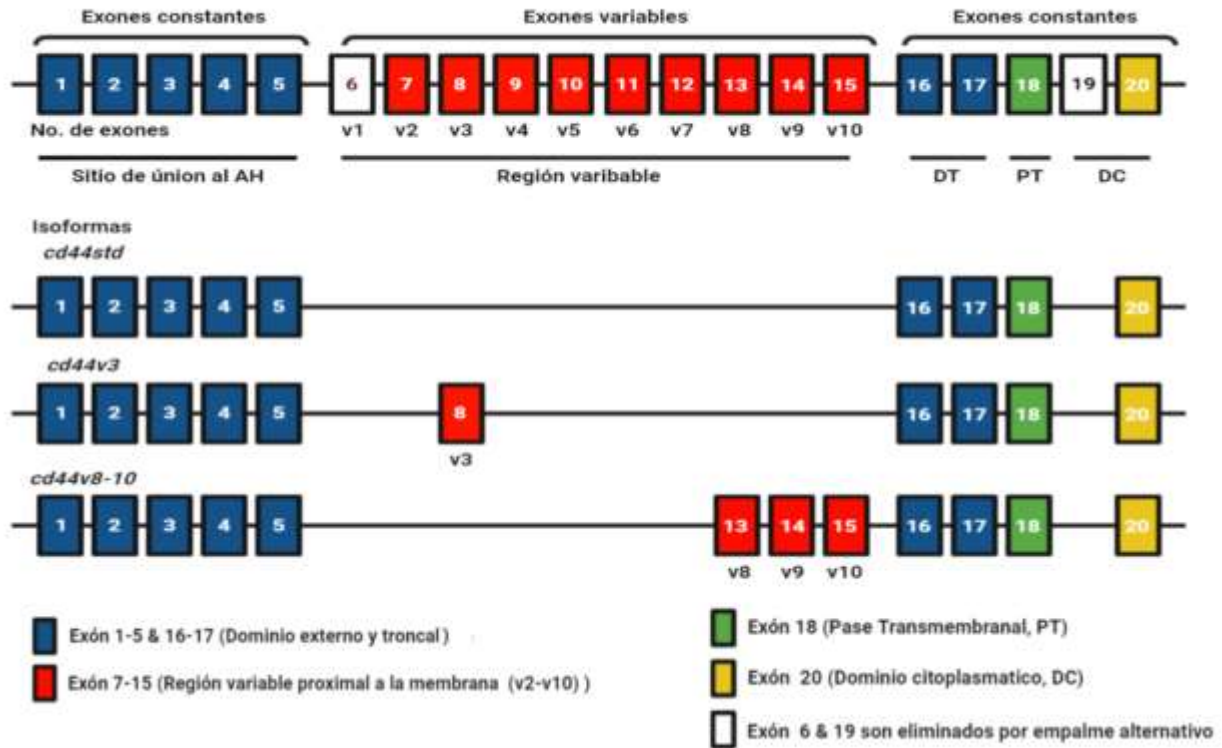


Figura 3. Estructura genómica y codificación de *cd44*. La estructura genómica de *cd44* consta 20 exones genómicos, donde 9 son exones constantes y 9 son exones variables. Dos exones son eliminados debido a que codifican a un codón de paro (v1) o se eliminan automáticamente por empalme alternativo. La codificación de los exones de *cd44* se da la siguiente manera: Exones 1-5 & 16-17 codifican el dominio externo (DE) responsables de la unión al HA y el dominio troncal (DT). Los exones 7-15 forman la región variable conocida como v2-v10. El exón 18 es el pase transmembranal (PT). El exón 20 corresponde al dominio citoplasmático (DC). Cabe destacar que el exón 6 codifica para un codón de paro y el exón 19 es eliminado en el proceso de empalme alternativo. (Elaborado en BioRender: <https://biorender.com/>).

Estructura proteica de CD44. Todas las isoformas de CD44 son glicoproteínas transmembranales que se expresan de manera ubicua en leucocitos, células epiteliales y CSC [54]. CD44 consiste en cinco dominios funcionales: dominio extracelular o ectodominio (DE), el dominio variable (DV), el dominio troncal (DT), el dominio transmembranal (TM) y el dominio intracelular (DI) [55]. El DE de CD44 actúa como receptor para el HA, que es un polisacárido importante presente en la matriz extracelular y compuesto por unidades repetidas de ácido- β -1-4-D-glucurónico- β -1,3,-D-N-acetilglucosamina [65]. La región de unión al HA es compartida en todas las isoformas de CD44. Sin embargo, la unión a HA induce cambios conformacionales en el ectodominio de las isoformas CD44v lo que permite la interacción de correceptores para otros ligandos como osteopontina, colágena y metaloproteasas en la matriz extracelular [66, 67]. El DE de CD44 también puede ser liberado de la membrana celular mediante metaloproteasas como MT1-MMP, ADAM10 o MMP9 lo que promueve la migración celular [68]. El dominio TM es de un solo paso y proporciona una plataforma de señalización para factores de crecimiento, cofactores y proteínas cinasas lo que facilita la señalización de CD44 [69]. Por otro lado, el DI de CD44 desempeña un papel importante en varios aspectos. Su interacción con proteínas del citoesqueleto ezrina, radixina y miosina (ERM) mediante la fosforilación de la cola citoplasmática de CD44, remodela el citoesqueleto de actina y afecta las vías de señalización de Ras, MAPK y PI3K/Akt en células tumorales. Esto promueve funciones como adhesión, migración, quimiorresistencia, invasión y sobrevivencia [55, 70, 71]. Además, el DI de CD44 contiene una señal de localización nuclear y tras ser escindido por presenilina - γ - secretasa puede translocarse al núcleo a través de CBP/p300 o STAT3 [72], lo que regula a los genes como *cd44*, *ciclinaD1*, *oct4*, *sox2*, *nanog*, *hif-2 α* , *c-myc*, y *twist1* [73-76]. La complejidad en CD44 y sus funciones se ve incrementada por modificaciones postraduccionales, incluyendo N- y O- glicosilación, fosforilación, sulfonación y escisión del ectodominio [64]. Las funciones de CD44 incluyen adhesión celular, migración, invasión y sobrevivencia (**Figura 4**). La diversidad de funciones de CD44 ha llevado a que se le considere como un marcador de CSC.

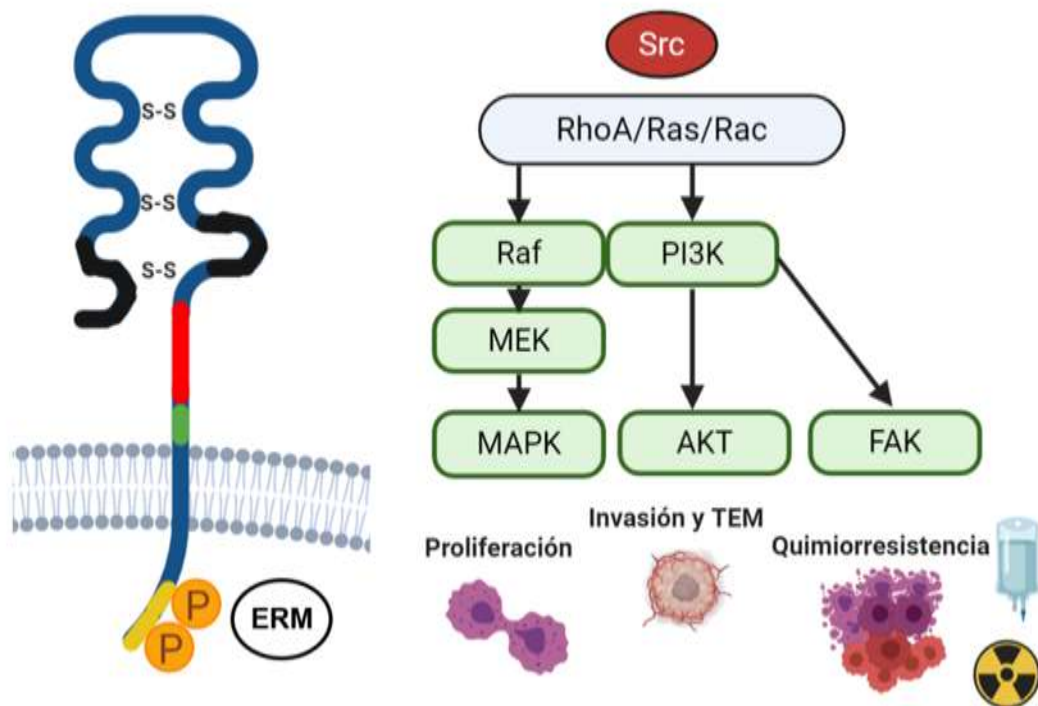


Figura 4. Estructura proteica, señalización y función de CD44. CD44 es el receptor del HA y puede unirse a otros ligandos como osteopontina, colágenos y metaloproteasas presentes en la matriz extracelular, funcionando como una plataforma de interacción para factores de crecimiento. Se ha descrito que el dominio intracelular de CD44 puede interactuar con el citoesqueleto a través de las proteínas. Como la proteína ERM, lo que influye en la activación y regulación de Src mediante la interacción con efectores como RhoA, Ras y RAC1. Esto activa posteriormente, vías oncogénicas como MAPK y las vías de PI3K/AKT que promueven diversas funciones en células tumorales, lo cual incluye la proliferación celular, la invasión, la migración y la quimiorresistencia. (Elaborado en BioRender: <https://biorender.com/>).

CD44 como marcador de CSC

El uso de CD44 como marcador de CSC, ya sea de manera individual o en conjunto con otros marcadores de CSC, ha sido ampliamente documentado en varios tipos de cáncer [57, 77]. En el caso del carcinoma nasofaríngeo, se ha observado que la población CD44⁺ es más proliferativa y radioresistente en comparación a CD44⁻ [78]. Un ejemplo adicional se encuentra en el cáncer gástrico donde células CD44⁺ exhiben propiedades como la autorenovación, el crecimiento sin anclaje, la quimiorresistencia, y la capacidad de diferenciación a células CD44⁻. La eliminación de CD44 conlleva a una disminución de esferoides y a tumores más pequeños en ratones inmunodeficientes [79]. En cáncer de mama, se ha utilizado la detección del fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}, mostrando un potencial tumorigénico en ratones inmunodeficientes con tan solo 100 células. Al realizar xenotrasplantes de manera consecutiva, los nuevos tumores generados continúan produciendo subpoblaciones CD44⁺/CD24^{-bajo} y no tumorigénicas [80]. En otros experimentos relacionados con el cáncer de mama, se ha determinado que la población CD44⁺/CD24^{-bajo} contiene características de CSC y cuando se agrega el fenotipo ALDH1⁺, muestran un comportamiento migratorio y metastásico [37]. Convincientemente, se ha evaluado el papel funcional de CD44 como marcador de CSC, demuestra que es posible reprogramar transcripcionalmente a células de cáncer de colon de CD44⁻ a CD44⁺ con características de CSC [75]. En cáncer de hígado, a diferencia de otros tipos de cáncer, se ha propuesto que CD44 podría ser de mayor utilidad cuando se combina con otros marcadores. Se han aislado células CD44⁺ a partir de dos líneas celulares (MHCC97L y PLC), y desarrolla tumores en ratones desnudos. Sin embargo, al aislar células CD90⁺/CD44⁺ se encontró una mayor capacidad de inducir metástasis a pulmón en comparación de CD90⁺/CD44⁻ [81]. De manera similar, otros autores mencionan que al aislar células CD44^{+/alto} en cáncer de hígado, no son superiores a las células CD44^{-bajo}, en cuanto a crecimiento clonogénico y tumorigenicidad. Además, las células CD133⁺/CD44⁺, se definen como una subpoblación de CSC metastásica a pulmón en ratones inmunodeficientes [82] (**Tabla 2**).

Tabla 2. CD44 como marcador de CSC en diferentes tipos de cáncer.

Fenotipo	Tipos de cáncer	Características de CSC	Referencia
CD44⁺	Cáncer nasofaríngeo	Alta actividad clonogénica ante la radioresistencia y la quimiorresistencia.	[78]
CD44⁺	Cáncer de estómago	Autorenovación, crecimiento sin anclaje y diferenciación a CD44 ⁻ .	[79]
CD44⁺/CD24⁻	Cáncer de mama	Alto potencial tumorigénico en xenotrasplantes seriados ratones inmunodeficientes.	[80]
CD44⁺/CD24⁻/ALDH1⁺	Cáncer de mama	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ contenía características de CSC CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /ALDH1 ⁺ demostraban propiedades migratorias y metastásicas.	[37]
CD44⁺	Cáncer de colón	La reprogramación de células CD44 ⁻ a CD44 ⁺ permitió la ganancia de propiedades de autorenovación, diferenciación y tumorigénesis.	[75]
CD44⁺/CD90⁺	Cáncer de hígado	Genera tumores pequeños y con capacidad metastásica a pulmón.	[81]
CD44⁺/alto CD44⁻/bajo	Cáncer de hígado	Las células CD44 ⁺ /alto, no son superiores a las CD44 ⁻ /bajo, en cuanto a crecimiento clorogénico y tumorigenicidad. Por otro lado, células CD133 ⁺ /CD44 ⁺ , como una subpoblación de CSC metastásica a pulmón en ratones inmunodeficientes.	[82]

Aparentemente, esto nos indicaría que CD44 no podría ser utilizado como marcador de CSC en cáncer de hígado. Sin embargo, la mayoría de los estudios donde se analiza la expresión de CD44 se realiza mediante anticuerpos que detectan la expresión total de CD44 (CD44std + CD44v) y no una isoforma específica de CD44. Por lo que, el estudio de las distintas isoformas de CD44 podría arrojar luz sobre por qué CD44 se asocia como marcador de CSC en algunos tipos de cáncer y en otros no. Un ejemplo que respalda esta idea se encuentra en el cáncer gástrico. En el modelo de ratón Gan en el cual existe una señalización sostenida de Wnt y E2 en mucosa gástrica, se ha observado que los ratones *CD44^{+/+}* desarrollan tumores y con baja supervivencia. Además, se ha relacionado un aumento de la expresión de la isoforma CD44v8-10 con tumores gástricos de gran tamaño. En contraste con ratones Gan *CD44^{-/-}*, los cuales desarrollaron tumores más pequeños [83]. Recientemente se ha descrito que la expresión de CD44std proporciona características de CSC en una línea celular de cáncer de hígado [84]. De acuerdo a estos estudios, parece que el análisis de las diferentes isoformas de CD44 podría proporcionar una mejor idea sobre el comportamiento de las CSC en diferentes tipos de cáncer.

Papel crucial de las isoformas de CD44 en cáncer y uso como marcadores de CSC

Se ha reportado que varias isoformas de CD44 son expresadas preferentemente en células tumorales [85-89]. Las diversas isoformas de CD44 desempeñan funciones específicas en el desarrollo tumoral de diferentes tipos de cáncer. En el cáncer gástrico, la isoforma CD44v8-10 interactúa directamente con el transportador de glutamato-cisteína, aumentando el nivel de glutatión reducido. Este aumento en el glutatión reducido actúa como una defensa contra las especies reactivas de oxígeno, inhibiendo la señalización por p38/MAPK y en última instancia promueve el desarrollo tumoral [83]. En células de leucemia, las isoformas CD44v6 y CD44v8-10 tienen un papel relevante. Estas isoformas interactúan directamente con Fas, lo cual interfiere con su trimerización. Esto evita la señalización del ligando de FAS y activación de componentes río abajo (FADD y Caspasa-8) lo que previene la apoptosis [90]. Las isoformas de CD44 también participan activamente como correceptor de varios receptores de tirosina cinasa (TKR), relacionando con la invasión y la metástasis [91]. El receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR), en particular ErbB1 y ErbB2, se encuentra desregulado en el cáncer de mama [92]. Se ha demostrado que CD44v6 es necesario como correceptor de ErbB1, y permite la unión del factor de crecimiento endotelial (EGF) y epiregulina, esto se ha correlacionado con metástasis en ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama y metástasis en pulmón en ratones *Balb/c*. Mientras que la señalización de proheparina unida al EGF era dependiente de CD44v3 y sus cadenas de heparina sulfato para la señalización de ErbB4, fosforilando a ERK [93]. Esto determina un reclutamiento diferencial entre isoformas de CD44 como correceptores para la señalización de EGFR. Otra TKR relacionada con CD44 es el receptor c-Met; una vez que el factor de crecimiento de hepatocito (HGF) se une requiere la activación de ERM en la cola citoplasmática de CD44v6, para iniciar la señalización de Ras/MAPK, y promover las funciones de migración y proliferación en células de cáncer de colon [94]. Similarmente, la activación del EGF y su receptor/CD44v6 cumple casi el mismo

papel con c-Met [95]. En el caso de CD44std, se ha asociado con un comportamiento mesenquimal e invasivo en cáncer de hígado y en cáncer cérvico uterino. Esto está relacionado con la activación de TGF- β [60, 96] **(Figura 5)**.

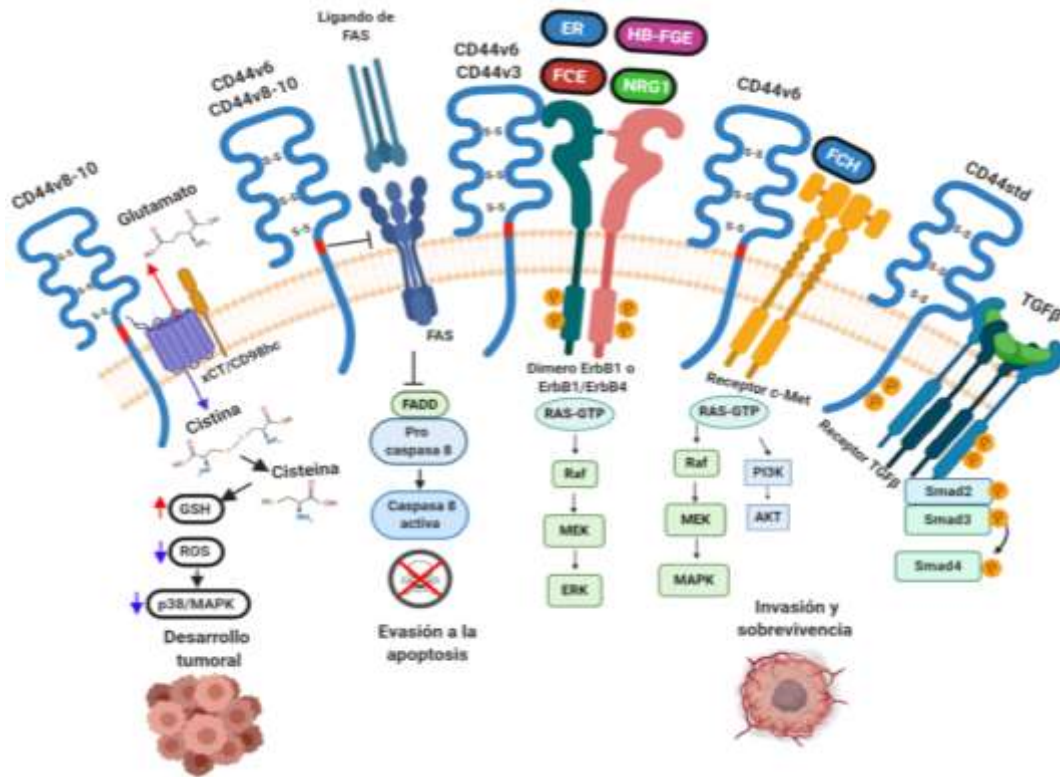


Figura 5. Función de isoformas de CD44 en el cáncer. CD44v8-10 interactúa directamente con el transportador de glutamato-cisteína, lo que aumenta el nivel de glutatión reducido y protege contra especies reactivas de oxígeno. Esta acción inhibe la señalización de p38/MAPK y promueve el desarrollo tumoral. CD44v6 y CD44v8-10, estas isoformas interactúan directamente con Fas, interfiriere con la trimerización del receptor de Fas, evita la señalización y activación de componentes de FADD y Caspasa-8 para evitar la apoptosis. CD44v6 actúa como correceptor de ErbB1, permitiendo la unión del EGF y epiregulina. Mientras que la señalización de proheparina unida al EGF era dependiente de CD44v3 y sus cadenas de heparina sulfato para la señalización de ErbB4, fosforilando a ERK y desencadenando un comportamiento invasivo. El receptor c-Met y CD44v6, una vez que el HGF se une a c-Met requiere la activación de ERM en la cola citoplasmática de CD44v6 para iniciar la señalización de Ras/MAPK y permitir las funciones de migración y proliferación. CD44std, esta isoforma se ha asociado con un comportamiento mesenquimal e invasivo relacionado a la activación de TGF- β . (Elaborado en BioRender: <https://biorender.com/>).

Las diferentes isoformas de CD44 desempeñan roles específicos en la identificación y función de las CSC en diversos tipos de cáncer. Esto respalda la idea de que el análisis de las isoformas de manera individual o en combinación con otros marcadores de CSC podrían ayudar a identificar a las CSC en diferentes tipos de cáncer, de manera más precisa que CD44 total (CD44std + CD44v). A continuación, se resumen algunos de los hallazgos relevantes en diferentes tipos de cáncer. Se ha identificado que CD44v6 identifica a las CSCs en el cáncer de colon que conducen a la metástasis [94]. Recientemente, también se ha descrito que la población CD44std⁺ muestra características quimiotácticas e invasivas, mientras que las células CD44v9⁺ mantenían un potencial de diferenciación seriada a CD44std⁺ y generación de tumores en cáncer de vesícula biliar [97]. Aparentemente, la inducción de CD44v8-10 en MCF-7, una línea celular que no expresa isoformas de CD44, aumento la migración y formación de esferoides [98]. Del mismo modo, en experimentos usando ratones knockin que expresan ya sea CD44v4-10 o CD44std, han demostrado que CD44v, y no CD44std, promueve la iniciación de adenomas de colon en ratones Apc (Min/+) por la señalización sostenida de Wnt [99]. Por otro lado, se ha correlacionado a CD44std, CD44v2-10, CD44v3-10 y CD44v8-10 con subtipos de cáncer de mama y marcadores de CSC [100]. Mientras, CD44v8-10 es la isoforma variante más comúnmente encontrada en muestras de cáncer gástrico junto con EpCAM, sirve como marcadores específicos para CSC [101]. De manera similar CD44v3⁺/ALDH⁺ son marcadores de CSC en cáncer de cabeza y cuello [102]. Sin embargo, se ha estudiado muy poca la capacidad de las diferentes isoformas de CD44 para identificar CSC en el cáncer de hígado y determinar las funciones que cumplen estas isoformas.

Tabla 3. Funciones de CSC en diferentes isoformas de CD44.

Isoformas de CD44	Tipos de cáncer	Características de CSC	Referencia
CD44v6	Cáncer colon	Determina CSC con propiedades metastásicas	[94]
CD44std CD44v8-10	Cáncer de vesícula biliar	CD44std: Subpoblación invasiva y quimiotáctica CD44v8-10: Subpoblación con capacidad de autorenovación, diferenciación y tumorigénesis	[97]
CD44v8-10	Cáncer de mama	La inducción de expresión de CD44v8-10 provoco un aumento en la migración y formación de esferoides	[98]
CD44v4-10	Adenocarcinoma de colon	CD44v4-10, promueve la iniciación de adenomas de colon en ratones Apc(Min/+) mediante la señalización de Wnt	[99]
CD44std CD44v2-10 CD44v3-10 CD44v8-10	Cáncer de mama	Se ha correlacionado con subtipos de cáncer de mama y marcadores de troncalidad	[100]
CD44v8-10⁺/EpCAM⁺	Cáncer de estomago	Fueron utilizados en ensayos de tumorigénesis con un número mínimo de células en ratones inmunodeficientes	[101]
CD44v3⁺/ALDH⁺	Cáncer de cabeza y cuello	Altamente quimioresistentes, con características de autorenovación y formación de esferoides	[102]

Isoformas de CD44 en cáncer y su relación con TGF- β

El cambio de isoforma de CD44 en diferentes tipos de cáncer ha sido ampliamente reportada. El patrón de expresión de las isoformas de CD44 cambia a lo largo del eje epitelio-mesénquima, lo cual genera isoformas específicas con efectos fenotípicos particulares. En este contexto, CD44 desempeña un papel integral al operar río arriba y abajo en los programas de transcripción relacionados con la EMT. Durante la EMT en diversos tipos de cáncer, se produce un cambio en CD44 de su isoforma CD44v, que está más estrechamente vinculada con el fenotipo epitelial, hacia CD44std [103]. En el contexto de la EMT, también se señala a ESRP1 como el principal regulador de la expresión de las isoformas de CD44, y su actividad conduce a la inclusión de exones variantes en la región central de la proteína [104]. Por lo tanto, ESRP1 regula el procesamiento postraduccional de una extensa red de proteínas que mantienen el fenotipo epitelial, y su alteración resulta en la pérdida de la EMT. Uno de los inductores descritos en la EMT es TGF- β , por lo cual induce la expresión de CD44std a través de la inhibición de las ESRPs. Este cambio de isoforma de CD44 puede ser regulado por TGF- β a través de las SMAD3 y la proteína de unión múltiple 1 (PCBP1) [105, 106]. Además, estos cambios de la expresión de isoformas a CD44 no solo está asociado con una presencia en el fenotipo epitelial o mesenquimal, sino también con rasgos de CSC en diferentes tipos de cáncer. Se ha reportado que en cáncer de ovario, CD44 fue asociada a los rasgos de CSC y EMT, y su regulación mediante los factores de transcripción como Snail y Zeb1 [107]. En línea con los resultados anteriores, en este mismo tipo de cáncer, CD44v6 se correlacionaba con la expresión de β -catenina y TGF- β [108]. El cambio de CD44v a CD44std a partir de la desregulación de ESRP1 se asoció con la expresión de ALDH1 y un estado metabólico quiescente [109]. Por otro lado, la regulación de PCBP1 por parte de TGF- β y EGF por SMAD3 favorece la expresión de CD44std con un fenotipo mesenquimal [96]. Este hallazgo se repite en CSC de próstata después del tratamiento de TGF- β , donde se reporta a PCBP-1 como un actor activo en el cambio de CD44v a CD44std siendo esencial para EMT y expresión de otros

marcadores de CSC [106], es un resultado que contrasta con la influencia de TGF- β en la sobreexpresión de CD44std; un ejemplo de esta contradicción es lo reportado en cáncer esofágico escamoso, donde CD44v9 aumento su expresión ante la presencia de TGF- β , aunque sin ahondar en el comportamiento de efectores como PCBP1 o ESPR1. Esta variación se asocia principalmente con un comportamiento migratorio e invasivo [110]. En cáncer gástrico, se encontró una inducción de vimentina inducida por TGF- β inducido por EMT junto con la expresión de CD44v3,8-10 con comportamiento invasivo y migratorio [111]. En conjunto, estos datos muestran como la relación del cambio de isoforma en CD44 pueden favorecer rasgos de CSC y EMT en diferentes tipos de cáncer, pero con una presencia diferencial de CD44std o CD44v. La siguiente tabla enfatiza los cambios de isoformas de CD44 en diferentes tipos de cáncer (**Tabla 3**).

Tabla 4. Cambios de isoformas de CD44 en diferentes tipos de cáncer por TGF- β .

Cáncer	Cambio de isoforma	Papel de CD44	Referencia
Cáncer de próstata	CD44v a CD44std	TGF- β desregula PCBP1 llevando a un cambio de isoforma	[106]
Cáncer de ovario	CD44v a CD44std	Desregulación de ESRP1 por TGF- β	[107, 109]
Cáncer de esófago escamoso	CD44v9	Sobrerregulación de CD44v9 y EMT	[110]
Cáncer de gástrico	CD44v3,8-10	Expresión de vimentina y EMT	[111]

2. ANTECEDENTES

Isoformas de CD44 en el carcinoma hepatocelular y su relación con TGF- β

Según los datos de Globocan en el 2020, el cáncer de hígado se coloca mundialmente como el tercer cáncer más mortal, solo detrás del cáncer de estómago y pulmón [112]. Aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de hígado, se diagnostican como carcinoma hepatocelular (HCC) con una incidencia de 800,000 casos por año a nivel mundial [113]. Los factores de riesgo para desarrollar HCC, pueden resumirse en infecciones previas con hepatitis B o C, abuso de la ingesta de alcohol, síndrome metabólico y consumo de alimentos contaminados por aflatoxina B1 [114]. El HCC tiene un pronóstico desfavorable con una supervivencia de solo seis meses debido a un diagnóstico tardío. Las terapias existentes son limitadas, e incapaces de erradicarlo, prevenir la metástasis o de evitar la recurrencia [115]. En el HCC, el estudio de las isoformas de CD44 ha sido estudiado por mucho tiempo. En el año 2000, se asoció la expresión de las isoformas CD44std, CD44v5, v6, v7-8, v10 en el HCC con un pronóstico desfavorable y la presencia de metástasis [116]. Es de resaltar que la mayoría de los estudios asocian la expresión de CD44std con inducción de la EMT [60]. CD44v6 se ha asociado con características invasivas *in vitro*, pero sin un valor clínico significativo [117]. Recientemente, el estudio de las isoformas de CD44 en el HCC se ha enfocado evaluar su función y su potencial como marcadores de CSC. Se ha descubierto que en las células de hepatoma celular, un subtipo de cáncer de hígado, al cultivarlas en esferoides, presentaron características similares a CSC con alto potencial metastásico. Esto se evidenció con un aumento en la expresión de CD44v8-10, y una disminución de la expresión CD44std como se observó en el análisis de expresión a través de RNA-seq [118]. Por otro lado, en un estudio donde se realizó la eliminación de CD44std en las células Huh7, se observó una mayor sensibilidad a los tratamientos de quimioterapia, una disminución en la formación de esferoides y una mayor expresión de marcadores de CSC como *cd133* y *epcam*. Además se detectó una

desregularización inducida por ROS [84]. La relación entre TGF- β , las isoformas de CD44 y las CSC en el HCC es de gran relevancia. Un estudio evaluó el impacto del tratamiento con TGF- β en la expresión de CD44, reveló que fortaleció la vía de señalización AKT/GSK3- β / β -catenina que resultó en un aumento de la migración, invasión y formación de esferoides [119]. En contraste, la inhibición de la expresión de CD44std, bloqueó la EMT inducida por TGF- β . Investigaciones adicionales han demostrado una mayor presencia de CD44 en células tumorales circulantes en comparación con el tumor primario, con una asociación a la EMT. Desde una perspectiva clínica, la expresión de CD44std en los tumores de HCC se relacionó con un perfil más mesenquimal y un pronóstico desfavorable [120]. También, se identificó la presencia de CD44std en el HCC, cuya expresión contribuye tanto a la EMT como a la formación de esferoides. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en el papel de CD44std en la EMT mediada por TGF- β , lo cual deja un vacío en la comprensión del comportamiento de las isoformas CD44v y sus implicaciones en las características de las CSC [121]. Por lo cual, proponemos llevar a cabo un análisis de los rasgos de CSC en subpoblaciones que expresen diferentes isoformas de CD44, con el objetivo de explorar las modificaciones en estas características después del tratamiento con TGF- β .

3. JUSTIFICACIÓN

La identificación de isoformas de CD44 se ha relacionado con la progresión tumoral y con la manifestación de un fenotipo de CSC en el HCC. Sin embargo, los rasgos específicos de las CSC no han sido definidos completamente en función de la expresión de las distintas isoformas de CD44. Además, no se han estudiado los efectos que el TGF- β pueda tener sobre los rasgos de CSC en subpoblaciones que expresan isoformas de CD44 en el HCC.

4. HIPÓTESIS

La estimulación con TGF- β exacerbará las características de las CSC en subpoblaciones que expresan isoformas de CD44.

5. OBJETIVO

General

El objetivo principal de este estudio es identificar las características de las CSC en células que expresan diferentes isoformas de CD44 y analizar cómo estas características se ven afectadas por la presencia de TGF- β .

Particulares

1. Analizar la expresión de *cd44* a nivel de exón e isoformas en bases de datos.
2. Validar la expresión de CD44 total e identificar sus isoformas en las diferentes líneas celulares de HCC.
3. Validar la purificación de isoformas de CD44.
4. Determinar comparativamente los rasgos de CSC en subpoblaciones de células que expresan CD44std y CD44v9.
5. Evaluar los cambios inducidos por TGF- β en las isoformas de CD44 y rasgos de CSC en subpoblaciones CD44std y CD44v9.
6. Analizar el proteoma de subpoblaciones CD44std y CD44v9, así como los cambios en la señalización inducidos por TGF- β .

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Análisis de datos transcriptómicos*

Los datos transcriptómicos de RNA-seq se obtuvieron a partir de la cohorte de cáncer de hígado (LIHC) del Atlas del Genoma de Cáncer (TCGA) que consta de un total de 330 muestras de pacientes utilizando el servidor UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/datapages/>). Los datos se separaron entre muestras tumorales (n =280) y muestras normales (n = 50). Estos grupos se compararon de acuerdo con la expresión total de *cd44* utilizando una prueba t. Los exones de *cd44* de estos datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías. El porcentaje de las isoformas de *cd44* se obtuvieron del servidor de ISOexpresso (<http://wiki.tgilab.org/ISOexpresso/>). La expresión de las isoformas de *cd44* se obtuvo de la plataforma TSVdb (<http://tsvdb.com/>). Los datos de expresión relativa se presentan en unidades de lecturas por millón de bases por kilobase (RPKM).

6.2. *Líneas celulares*

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de HCC del ser humano, HepG2 y Huh7, las cuales fueron crecidas de acuerdo con las indicaciones dadas por american type culture collection (ATCC). Se crecieron en medio modificado dulbecco-eagle (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y 100 unidades de antibióticos (ampicilina y estreptomina). Para el caso de la línea celular SNU-387, fue cultivada en medio roswell park memorial institute 1640 (RPMI 1640) suplementado con FBS al 10 % y 100 unidades de antibióticos (ampicilina y estreptomina). También, la línea celular SNU-423 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con FBS descomplementado al 10 % y 100 unidades de antibióticos (ampicilina y estreptomina). Todas las líneas celulares crecieron en ambiente húmedo a 37°C y 5 % de CO₂.

6.3. Disgregación celular

Para lograr un marcaje eficaz de los marcadores de superficie en las líneas celulares se eligió una disgregación celular suave [122]. Las líneas celulares fueron crecidas en placas de cultivo de P100 y P150 Corning Inc. (NY, USA) con una confluencia al 70 - 90 %. Se lavó 2 veces con PBS 1x y se retiró el sobrenadante. Se agregó 1 mL de Verseno (PBS 1x al 0.05 % de EDTA), se incubó por 5-10 min en ambiente húmedo a 37°C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se neutralizó con 1 mL de medio correspondiente de la línea celular y se realizó el conteo celular para verificar la densidad celular, la integridad y viabilidad con Azul Tripano a 0.004 % en una cámara de Neubauer.

6.4. Citometría de flujo

Las líneas celulares de HCC (1x10⁶) se incubaron con α -CD44 panespecifico-Alexa 700 (1:500; Cat. No. 561289) en la oscuridad durante 20-30 min a 4 °C. Mientras tanto, SNU-387 y SNU-423 se marcaron con α -CD44v9 (1:300; Cosmo Bio Co., LTD; Cat. No. LKG-M001). Las células marcadas con CD44v9 se incubaron luego con el anticuerpo secundario de rata FITC α (1:500; Invitrogen; Cat. No. 31629). Después de la incubación, las células se centrifugaron a 425 x g durante 5 min, se lavaron dos veces con PBS 1x al 2 % de FBS y rsuspendieron a 4 °C. Luego, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX-LX y el software CytExpert 2.1. Se registraron un total, de 15,000 eventos y se excluyeron del análisis las células muertas teñidas con yoduro de propidio así como los restos celulares.

6.5. Inmunocitoquímica

Las células de HCC (1x10⁵) se fijaron con 4% de paraformaldehído, se permeabilizaron con 0.1 % de Triton X-100 y se bloquearon con 3 % de albúmina sérica bovina (BSA). Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo primario α -CD44 (1:100; Abcam; Cat. No. ab189524) y el control de isotipo de conejo (1:100; Life Technologies; Cat. No. z30817), seguido de la incubación con

anti-rabbit-HRP por 1 h. Se utilizó un kit de sustrato DAB-Plus (Life Technologies; Cat. No. 002020) para la detección de señales, y la reacción se detuvo con agua Milli-Q (H₂O MQ). Las imágenes se capturaron con un microscopio óptico (Olympus IX70) controlado por un software de análisis de imágenes (analySIS®).

6.6. Separación celular magnética activada (MACS)

La separación celular magnética activada (MACS) se llevó a cabo utilizando el kit de separación celular magnética para CSC humanas CD44v9+ (Cosmobio; Cat. No. CSC-SEP1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Donde se utiliza la clona reportada de CD44v9 [123]. En resumen, se añadieron 5 µl de α-CD44v9 acoplado a perlas magnéticas en amortiguador de unión a 2.5x10⁶ células (1 mL), seguido de una incubación durante 20 min a 4 °C. Luego, fueron suspendidas con amortiguador de lavado y se centrifugó a 300 × g durante 3 min. Las células se colocaron ante un soporte magnético para recolectar a CD44v9+ por 5 min, mientras que las células CD44v9- se eluyó. Las células CD44v9- y CD44v9+ aisladas se utilizaron para experimentos posteriores.

6.7. Índice de área celular

Las células se sembraron en condiciones normales y se les permitió crecer durante 24 h. Después de este tiempo, se adquirieron imágenes de 6 campos diferentes con 30-50 células por campo utilizando un microscopio óptico (Olympus IX 70) controlado por un software de análisis de imágenes (analySIS®). El área relativa de las células se determinó calculando el área de las células individuales en función de la intensidad de píxeles utilizando el software ImageJ.

6.8. Western Blot

La obtención de proteína total fue realizada con un amortiguador de lisis RIPA, que contenía 100 µL/mL de un coctel de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche Applied Science, Mainheim Germany) y 10 µL/mL de inhibidores de fosfatasas FOSPHOSTOP (Roche Applied Science, Mainheim Germany). Se cargaron cantidades iguales de proteína (20 - 30 µg) en un gel 8-10 % SDS-PAGE

y se aplicó un voltaje de 80 V durante 30 min. Posteriormente, se aumentó el voltaje a 120 V por 2 h. La integridad de las proteínas fue verificada por la tinción con azul de Coomassie. Después, el equilibrio de las membranas SDS-PAGE fue llevado por 10 min para transferirse a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La transferencia del gel a la membrana de PVDF se realizó a 0.4 A por 2 h, posteriormente las proteínas transferidas a la membrana fueron teñidas en rojo con Ponceu S. El bloqueo de las membranas fue realizado con leche baja en grasa diluida en TBS o PBS 1x en Tween 20. La incubación con los anticuerpos fue realizada toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con TBS o PBS 1x en Tween 20, para posteriormente incubarse con el respectivo anticuerpo secundario 1 h a temperatura ambiente (TA). Después de 3 lavados con la respectiva solución se procedió a realizar una incubación de la membrana con luminol Millipore. Se incluye una tabla con detalles más específicas sobre los protocolos de los anticuerpos utilizados en este trabajo (**Anexo 1**).

6.9. Ensayo de clonogenicidad

Se sembraron 500 células por pozo, en placas de 6 pozos y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Después de 14 días de cultivo, se determinó el número de colonias formadas. Al final del experimento, las células se lavaron dos veces con PBS 1x, se fijaron con 4 % de paraformaldehído durante 15 min y se tiñeron con cristal violeta al 0.5 % durante 5 min. Se analizó el número de colonias formadas con al menos 50 células.

6.10. Ensayo de formación de esferoides

Se sembraron 500 células por pozo, en placas de 24 pozos con baja adherencia y cultivadas en medio DMEM/F12 libre de suero (Gibco) que contenía 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (hrEGF; Invitrogen), 10 ng/mL de factor de crecimiento básico de fibroblastos humano recombinante (hrbFGF; Invitrogen) y suplemento B27 al 2 % sin vitamina A (Invitrogen). El cultivo se realizó durante 15 días a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Las células se monitorearon durante 7-15 días.

6.11. Modelos animales

Se utilizaron ratones hembra de seis semanas de edad de la cepa NSG para los ensayos de xenotrasplante subcutáneo, ortotópico e inoculación por vía hematogena. Se emplearon jeringas 27G para la administración. Los ratones fueron anestesiados mediante una combinación de ketamina (Ketamin-Pet) y xilacina (Procin) en una proporción de (1:1) de 10 μ L de manera intramuscular. Posteriormente, se realizó los ensayos de xenotrasplantes los ratones que fueron monitoreados durante 6 semanas y posteriormente sacrificados.

6.11.1. Ensayo de xenotrasplante subcutáneo

Una vez anestesiados los ratones, se limpió la región lumbar derecha e izquierda. Las células SNU-423 (1×10^7), se suspendieron en una mezcla 1:1 (v/v) de PBS 1x estéril y Matrigel (Corning Inc.). Luego se inyectaron lentamente 100 μ L en la región lumbar previamente estéril. La inyección se realizó de manera exitosa cuando se observó la formación de una burbuja en el sitio de la punción. Se mantuvo la aguja en su lugar durante 15 seg para asegurar la retención del inóculo antes ser retirada del sitio de punción. Los ratones fueron monitoreados durante 6 semanas.

6.11.2. Ensayo de xenotrasplante ortotópico

Una vez anestesiado el ratón, se realizó una incisión en la línea del alba en la pared abdominal para exponer el hígado, a través de la modificación de la metodología reportada [124]. Después, las células SNU-423 (1×10^6) se mezclaron en una proporción 1:1 con Matrigel (Corning Inc.) antes de la inyección. Se administraron 20 μ L de esta mezcla de manera ortotópica en tres sitios diferentes: Dos en la izquierda- lateral y uno en el lóbulo izquierdo en el centro del hígado. Después de la inyección se suturó la incisión en la piel. Los ratones fueron monitoreados por 2 a 6 semanas después de la implantación. Se extrajo el hígado y pulmones para confirmar o descartar sitios de desarrollo tumoral y metástasis.

6.11.3. Ensayo de inyección por vena de la cola

Una vez anestesiado el ratón, se colocó en un sujetador de movimiento que permitía la salida de la cola para facilitar su manejo. Después, las células SNU-423 (1×10^6) son mezcladas en PBS 1x antes de la inyección. Se tomó la cola del ratón con firmeza y limpió el sitio de la inoculación aproximadamente 2/3 a partir de la base de la cola del ratón. Se inyectaron 50 μ L con un ángulo debajo de 45° en el sitio de punción y se mantuvo por 15 seg, para ser retirada del sitio de punción y asegurar la retención del inóculo. Los ratones fueron monitoreados por 2 a 6 semanas después de la implantación. Se extrajo el hígado y pulmones para confirmar o descartar sitios de desarrollo tumoral y metástasis.

6.12. Ensayo de adhesión

Se prepararon placas de 96 pozos fueron tratándolas previamente con 20 μ g/ml de fibronectina (Invitrogen) durante 2 h a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Después de retirar la fibronectina, los pozos se lavaron con PBS 1x y se incubaron con medio en BSA al 0.5% para bloquear las uniones no específica. A continuación, se sembraron 5×10^4 células por pozo en triplicado y las placas se incubaron durante 40 min a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Luego se retiró el medio, se lavaron las células tres veces con PBS 1x, se fijaron con metanol durante 15 min, se tiñeron con cristal violeta durante 5 min y se fotografió utilizando un microscopio óptico (Olympus IX 70). Finalmente, las células se disolvieron en PBS 1x con SDS al 2% y se midió su absorbencia a 550 nm.

6.13. Ensayo de migración por cicatrización de herida

Se sembraron 1×10^5 células por pozo, en placas de 24 pozos y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia completa o la formación de un monocapa celular. Luego, las células se colocaron en inanición de suero por 12 h y se trataron con 14 μ g de mitomicina durante 2 h para evitar el crecimiento celular. Se creó una herida rascando la monocapa en línea recta con una punta de pipeta de 1,000 μ L, y las células desprendidas se lavaron con PBS 1x. Se añadió medio fresco y la herida

se evaluó en diferentes momentos (0h, 24h y 48h). El cierre de la herida se documentó fotográficamente con un microscopio óptico (Olympus IX70).

6.14. Ensayo de invasión en cámara Transwell

El ensayo de invasión celular se realizó utilizando cámaras Transwell BD® con filtros de 8 μm . Los pocillos se recubrieron con Matrigel® Matrix Basement Membrane (Corning; Ref. No. 356237) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron células (1×10^5) por pozo en el inserto superior sobre una capa de Matrigel® en medio sin suero, y se añadieron 500 μL de medio con un 10 % de suero en el inserto inferior. Las células se incubaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO_2 . Luego, las células se fijaron con metanol frío durante 5 min y se retiró el medio del inserto. Las células se tiñeron con cristal violeta y se realizaron varios lavados con H_2O MQ.

6.15. Tratamiento con TGF- β

Después de la separación de subpoblaciones con MACS CD44v9 en SNU-423, las subpoblaciones CD44std y CD44v9 fueron no tratadas (NT) con RPMI 1640 completo y tratadas con TGF- β (T) (Cat# 100-21; PEPROTECH) a una concentración de 2 ng/mL por 72 h.

6.16. Preparación de muestras para espectrometría de masas

La extracción de proteínas de subpoblaciones de CD44std y CD44v9 posterior al tratamiento, se realizó usando RIPA. Se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas para mantener la integridad de las proteínas; se prepararon cantidades iguales de proteína para los estudios proteómicos. Para cada muestra biológica (subpoblaciones de CD44std y CD44v9, NT y T), se recolectaron 1×10^6 células, se lavaron y se centrifugaron. El homogeneizado de proteínas se incubó por 30 min a 4 °C, y se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó. Las concentraciones de proteína se midieron utilizando la curva de Lowry y se utilizaron 20 μg de las proteínas para cada condición y réplicas biológicas, las cuales se sometieron a electroforesis en gel de

SDS al 10 % y tinción con Azul de Coomassie para verificar la integridad de las muestras. Posteriormente, las muestras se procesaron para espectrometría de masas de acuerdo con el protocolo. Las muestras de proteínas se digirieron usando 50 μ L de una mezcla Lys-C/Trypsin (reactivo “Digest”) y se calentaron a 37 °C durante 2 h. Los péptidos resultantes se purificaron en un Cartucho iST utilizando el amortiguador de lavado 1 para eliminar los contaminantes hidrofóbicos y el amortiguador de lavado 2 para eliminar contaminantes hidrofílicos. Posteriormente, los péptidos se eluyó y utilizó el reactivo de elución y posteriormente evaporado a sequedad en un SpeedVac. Finalmente, los péptidos se suspendieron con el reactivo “LC-Load” y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por LC-MS.

6.17. Análisis por espectrometría de masas DIA Label-Free

El análisis cuantitativo de proteómica incluyendo condiciones espectrométricas y cromatográficas, se realizó en un UPLC Nano Acquity M-Class en conjunto con un espectrómetro de masas QTOF Synapt G2-Si (Waters; Milford, MA, EE. UU.), según el método desarrollado por Emmanuel Ríos, 2020 [125]. Los archivos *.raw generados se analizaron en el software Progenesis QI para Proteomics v3.0.3 (Waters; Milford, MA, EE. UU.) según los escenarios, con las siguientes modificaciones: usamos una base de datos en formato *.fasta concatenado Base de datos de Homo sapiens (descargada de Uniprot), que contiene 73.099 secuencias de proteínas, actualizada por última vez el 11 de octubre de 2022. La calibración del Synapt G2-Si se realizó con [Glu1]-fibrinopéptido fragmentado a través del ion precursor $[M + 2H]^{2+} = 785.84261$ con una fragmentación de 32 eV logrando una precisión menor a 1,1 ppm en todas las mediciones de MS/MS. Las relaciones se calcularon en base en la respuesta promedio de señal MS promedio de los tres péptidos trípticos más intensos (Top3) de cada proteína caracterizada en las muestras CD44std y CD44v9 con TGF- β (tratadas) en comparación con el Top3 de cada proteína en las muestras CD44std y CD44v9 (no tratadas).

6.18. Análisis bioinformático

Los datos proteómicos generados se analizaron a partir de archivos de Excel con los nombres de: “CD44std NT vs CD44std TGF- β ” y “CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β ”. Estos datos que contienen proteínas previamente filtradas se visualizaron a través de un gráfico Volcano plot, que se generó con el servidor VolcaNoseR, disponible en línea (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR/>; consultado el 15 de mayo 2023). Los perfiles de expresión diferencial fueron evaluados por un mapa de calor, que se generó con un web server heatmapper, disponible en línea (<http://heatmapper.ca/>; consultado el 28 de mayo 2023). Se utilizaron métodos de ligamiento completo, agrupamiento y distancia de Pearson. Las proteínas cuya expresión mostró diferencias significativas se clasificaron según sus vías biológicas con la base de datos Reactome Pathways contenida en STRING v11 (disponible en línea: <https://string-db.org/>; consultado el 8 de junio de 2023).

Las proteínas exclusivas en los grupos CD44std NT vs CD44std TGF- β y CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β , se determinaron a partir las proteínas previamente filtradas del análisis de datos de estos grupos. Se utilizó un diagrama de Venn, para este propósito que se generó utilizando el servidor Venny 2.0, disponible (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>; consultado el 12 de junio de 2023). Estas proteínas exclusivas se sumaron a las proteínas diferenciales que ya se habían identificado como diferenciales entre los grupos CD44std NT vs CD44std TGF- β y CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β .

Adicionalmente, se realizó un análisis con la plataforma de Gene Ontology (GO) disponible en línea (<http://geneontology.org/>; consultado el 15 de junio 2023) usando las proteínas identificadas. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: vías biológicas, señalización, transducción de señales intracelulares e información. Finalmente, se llevaron a cabo análisis de interacciones moleculares entre las proteínas seleccionadas utilizando STRING (<https://string-db.org/>, consultado el 18 de junio 2023), que es una herramienta muy útil para el análisis de redes de interacciones moleculares entre proteínas. Todas las vías biológicas resultantes con un FDR (tasa de descubrimiento falso) de $p < 0.05$ se

consideraron altamente confiables se exportaron como un archivo. Los interactomas de proteínas expresadas diferencialmente también se hicieron en STRING, con la siguiente configuración: base de datos Homo sapiens; minería de texto, experimentos, base de datos, coexpresión, vecindad, fusión de genes y coocurrencia como fuente de interacción activa, y 0.4 como puntuación de confianza.

6.19. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó con el software GraphPad PRISM versión 6.01. Los datos se presentan en forma de gráficos y se expresan como promedio \pm desviación estándar de acuerdo con tres experimentos independientes. Para calcular las diferencias entre dos grupos, se utilizó la prueba t de Student, mientras que el análisis de ANOVA se empleó para evaluar las diferencias entre múltiples grupos experimentales. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1. Validación de CD44v8-10 como Marcadores en HCC, a Diferencia de CD44std

Se analizó la expresión total de CD44 y sus isoformas en muestras de la cohorte de cáncer de hígado en TCGA, la cual incluyó 330 pacientes. Se observó un aumento significativo ($p = 0.001$) en la expresión total de CD44 en las muestras de cáncer de hígado en comparación con las muestras control (**Fig. 6A**). El gen codificante de CD44 se compone de nueve exones variables ubicados entre nueve exones constantes. Siete de los exones constantes mostraron una expresión significativa ($p = 0.05$) en las muestras de tumores en comparación con las muestras control. De manera similar, para los exones constantes, los exones v8, v9 y v10 también mostraron una expresión significativa en las muestras de cáncer de hígado en comparación con las muestras control (**Fig. 6B**). A continuación, evaluamos el porcentaje de isoformas de CD44 a partir de los datos de TCGA en muestras control y tumor con CD44std (94 y 91.7%), CD44v8-10 (2.8 y 5.8%), CD44v10 (1.9 y 1.5%) y CD44v3-10 (0.5 y 1%), respectivamente (**Fig. 6C**). A partir de estas isoformas, nos concentramos en CD44std y CD44v8-10 y descubrimos que la expresión de CD44std en muestras de cáncer de hígado no era significativamente ($p = 0.3353$) diferente de las muestras de tejido hepático no tumoral. Sin embargo, la expresión de CD44v8-10 aumentó significativamente ($p = 0.0211$) en las muestras tumorales en comparación con las muestras no tumorales (**Fig. 6D**). Por lo tanto, estos hallazgos sugirieron que CD44v8-10 es un marcador potencial del HCC.

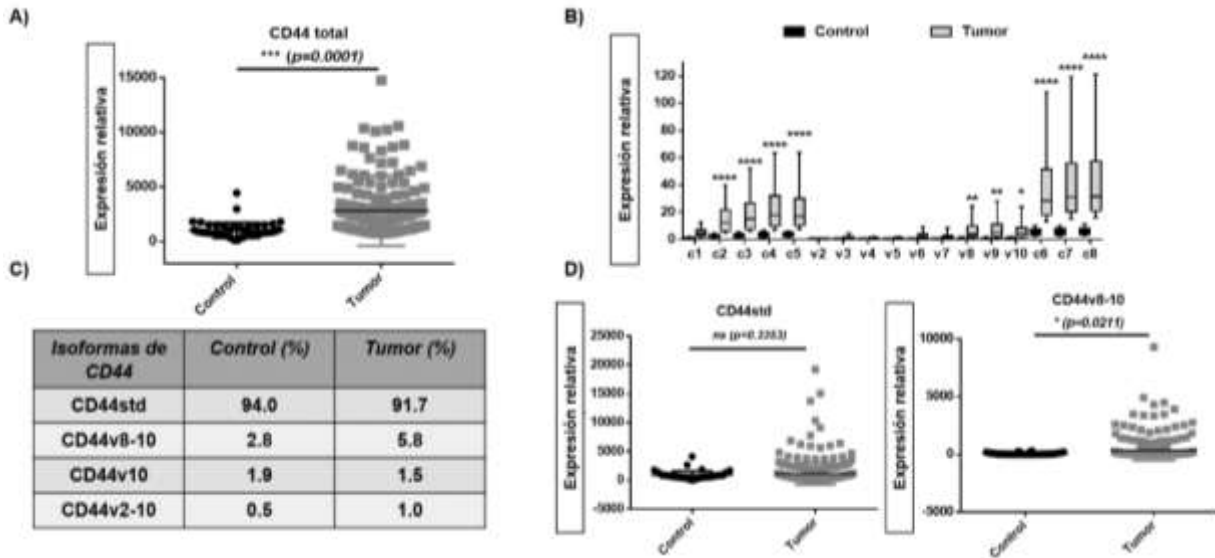


Figura 6. Expresión de CD44 Total, sus Exones e Isoformas en Datos de Cáncer de Hígado en TCGA. A) Se muestra el perfil de expresión de CD44 total en muestras de tejido control (n = 50) vs tumor (n = 280) con diferencias significativa. **B)** La expresión de exones constantes y variables (v8, v9 y v10) muestra diferencias significativas $p < 0.05$ en muestras de tumor vs control. **C)** Tabla de isoformas de CD44, basada en datos extraídos de la cohorte de cáncer de hígado en TCGA mediante ISOExpresso, se muestra el porcentaje de isoformas de CD44 expresadas en el HCC en el grupo control y en el tumor CD44std (94 y 91.7%), CD44v8-10 (2.8 y 5.8%), CD44v10 (1.9 y 1.5%) y CD44v3-10 (0.5 y 1%), respectivamente. **D)** Gráfico de expresión relativa de isoformas de CD44 (CD44std y CD44v8-10) en muestras de tumor en comparación con muestras de control a partir de datos extraídos de TSVdb.

7.2 Identificación de CD44std y CD44v9 en la Línea Celular SNU-423

Se realizó un análisis inmunocitoquímico de CD44 para determinar la expresión de CD44 en varias líneas celulares de HCC, incluidas las líneas celulares HepG2, Huh7, SNU-387 y SNU-423 (**Fig. 7A**). Se muestra expresión de CD44 abundante en las células SNU-387 y SNU-423, mientras que no se observó señal en las células HepG2 y Huh7. Para cuantificar aún más la población de CD44+, utilizamos citometría de flujo con un anticuerpo anti-CD44 pan-específico (G2426) que reconoce todas las isoformas de CD44, se obtuvieron poblaciones de CD44+ para todas las líneas celulares, excepto para las HepG2 y Huh7. La proporción de células CD44+ fue elevada en las células SNU-387 y SNU-423 (98,98% \pm 0,44 y 99,6% \pm 0,63, respectivamente) (**Fig. 7B**). A continuación, se utilizó el análisis por Western blot (WB) para evaluar la expresión de las isoformas de CD44 en diferentes líneas celulares de HCC (**Fig. 7C**). Las células SNU-423 tenían una expresión significativa ($p < 0.005$) para CD44std, mientras para CD44v ($p < 0.0005$) en comparación con las células SNU-387. Ambas líneas celulares expresaron abundantemente la isoforma CD44 estándar (CD44std, 85-90 kDa), mientras que las isoformas variantes de CD44 (CD44v, 120-130 kDa y 150 kDa) se expresaron en células SNU-423, siendo CD44std la isoforma más abundante. Se utilizó el anticuerpo CD44v9, debido a su capacidad para identificar a CD44v8-10, respaldado por los resultados obtenidos de diferentes bases de datos. Los datos de citometría de flujo indicaron que las células SNU-387 carecían de esta población, mientras que las células SNU-423 contenían un porcentaje de células CD44v9+ (35% \pm 0,83) (**Fig. 7D**). Estos resultados indicaron que las células SNU-423 expresan CD44std y CD44v9.

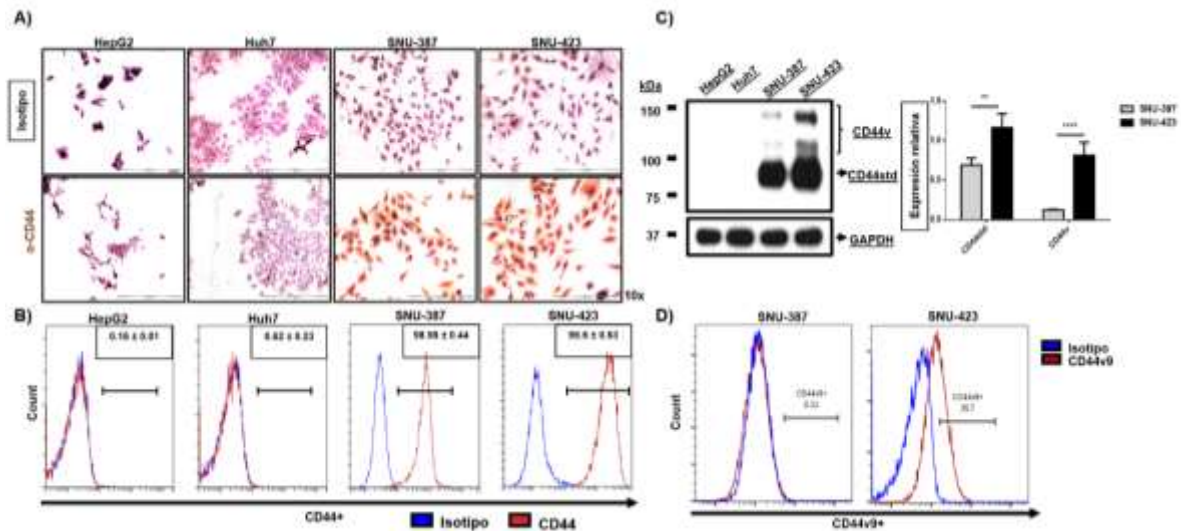


Figura 7. Expresión de CD44 y sus Isoformas en Líneas Celulares de HCC. A) Visualización de la expresión de CD44 mediante inmunocitoquímica en diversas líneas celulares de HCC (10x). Las barras de escala indican 0,2 mm. **B)** Histogramas que representan las poblaciones CD44+ en células HepG2, Huh7, SNU-387 y SNU-423. **C)** WB de CD44 total y sus isoformas, con GAPDH utilizado como control de carga. El gráfico de densitometría muestra las diferencias de expresión en SNU-387 y SNU-423. **D)** Histogramas que representan la expresión de poblaciones CD44v9+ en las células SNU-387 y SNU-423. El análisis densitométrico se representa como el promedio \pm DE. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$. Los datos se presentan como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

7.3. Purificación de Isoformas CD44v9- y CD44v9+ en Células SNU-423

A continuación, purificamos las subpoblaciones de CD44v9 de las células SNU-423 donde se utilizó un sistema de separación de células CD44v9 MACS. Antes de llevar a cabo esta separación, identificamos una población de CD44v9+ de aproximadamente el 35% en células SNU-423 mediante citometría de flujo. Después de la purificación, observamos que la subpoblación CD44v9- contenía un 12% de células CD44v9+, mientras que la subpoblación CD44v9+ tenía una pureza cercana al 99% (**Fig. 8A**). Cultivamos ambas subpoblaciones CD44v9- y CD44v9+ para confirmar su viabilidad y mantenimiento. Las células SNU-423 comprenden una mezcla de células poligonales y fusiformes. Las células CD44v9- adoptaron una morfología fusiforme mientras que las células CD44v9+ presentaron una morfología poligonal. A continuación, trazamos el área relativa de las células SNU-423, CD44v9- y CD44v9+. No hubo diferencias en el área relativa entre las células SNU-423 y CD44v9+, pero hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con las subpoblaciones CD44v9-, mientras para CD44v9+ ($p < 0.0005$) en el área relativa (**Fig. 8B**). Para validar la identidad de las isoformas de CD44 expresadas en las subpoblaciones CD44v9- y CD44v9+, evaluamos la expresión total de CD44 mediante análisis de WB con un anticuerpo anti-CD44 pan-específico. Las células CD44v9- mostraron una alta expresión de CD44std y una baja expresión de CD44v (**Fig. 8C**), mientras que las células CD44v9+ presentaron expresión prácticamente de CD44v9 pura. Por lo tanto, estos hallazgos confirmaron la purificación y la identidad de las subpoblaciones CD44v9- y CD44v9+. De ahora en adelante, CD44v9- se denominará CD44std, mientras que CD44v9+ se denominará CD44v9.

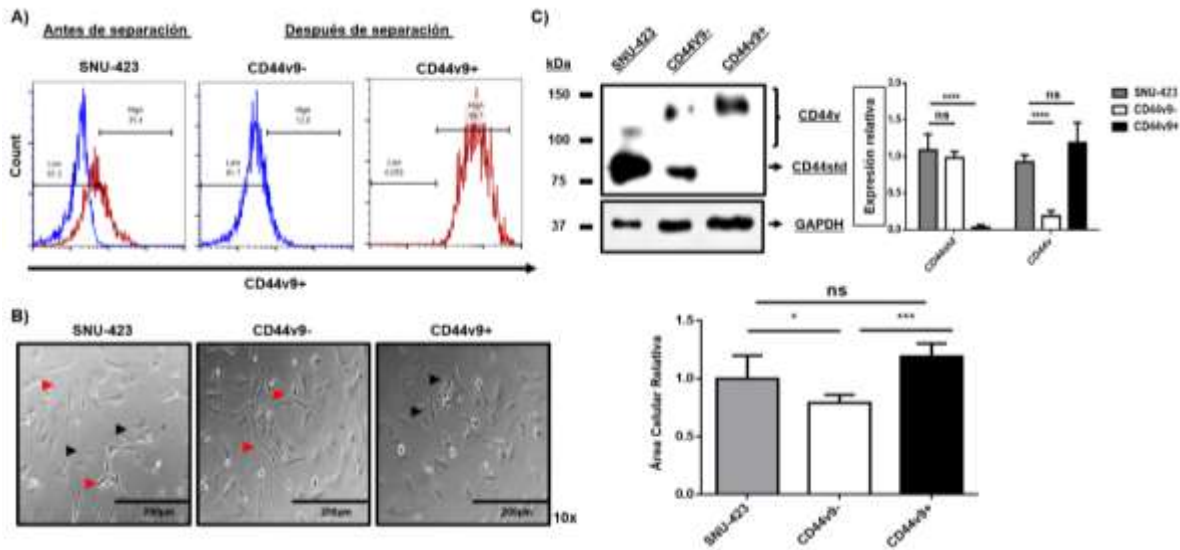


Figura 8. Validación de la Purificación de CD44v9- y CD44v9+ en Células SNU-423. **A)** Expresión de CD44v9 antes y después de la separación por MACS. **B)** Morfología comparativa de las subpoblaciones SNU-423, CD44v9- y CD44v9+ cultivadas en condiciones normales 24 h después de la separación de MACS (10x). Las barras de escala indican 200 µm. El gráfico muestra el área relativa de la celda. **C)** WB y análisis densitométrico de las isoformas CD44 en la proteína total de células SNU-423, CD44v9- y CD44v9+. Se muestra un histograma representativo, fotografías e imágenes del resultado de WB de tres experimentos independientes. Los datos significativos se indican con * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0005$.

7.4. Expresión de Factores de Transcripción de CSC y Características de Formación de Colonias y Esferoides en las Células SNU-423, CD44std y CD44v9.

Para explorar las características de CSC en las células SNU-423, CD44std y CD44v9, evaluamos la expresión de los factores de transcripción asociados a la troncalidad mediante WB (**Fig. 9A**). Observamos que las células SNU-423 no expresaban Oct4 en ninguna de las dos subpoblaciones. Sin embargo, detectamos la expresión de Sox2 y Nanog en células SNU-423. Además, observamos que Nanog se expresaba en las células CD44std, mientras que Sox2 se expresaba en células CD44v9. Seguidamente, evaluamos la capacidad de autorenovación *in vitro* de las CSC mediante ensayos de clonogenicidad y esferoides. Las células CD44v9 mostraron una capacidad significativamente mayor formación de colonias ($p > 0.0005$) y esferoides ($p > 0.005$) en comparación con las células CD44std y SNU-423 (**Fig. 9B y C**). También, se intentó establecer un modelo de xenotrasplante con SNU-423 y subpoblaciones (CD44std y CD44v9) en el modelo de ratón SCID. Sin embargo, no se logró el desarrollo tumoral (**Anexo 2**). En resumen, nuestros resultados muestran que SNU-423 no tiene características tumorigénicas, pero exhiben rasgos de CSC como la formación de colonias y esferoides. Además, las subpoblaciones en células CD44std y CD44v9 tienen características diferenciales de CSC formadoras de colonias y esferoides, que expresan los factores de transcripción Sox2 y Nanog, respectivamente.

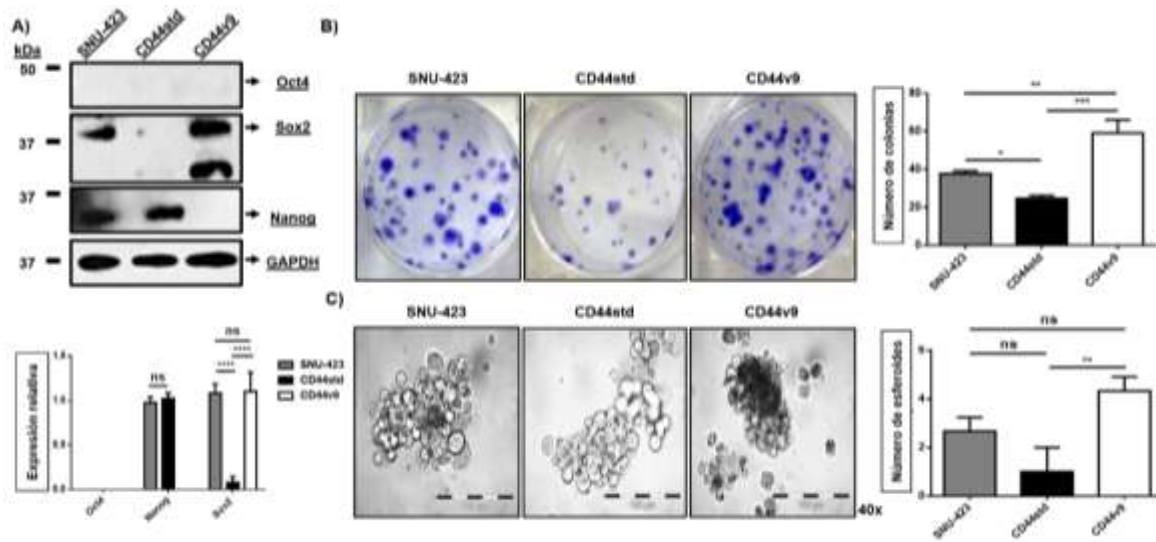


Figura 9. Expresión de Factores de Transcripción de CSC y Evaluación de la Formación de Colonias y Esferoides en Células SNU-423, sus Subpoblaciones CD44std y CD44v9. A) WB y densitometría de expresión de Oct4, Nanog y Sox2 en lisados de proteínas totales utilizando GAPDH como control. **B)** Ensayo de formación de colonias y gráfico que muestra el número de colonias contadas. **C)** Micrografías (40x) de los esferoides y gráfico que muestra el número de esferoides. Las barras de escala indican 100 μ m. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio \pm DE. Los datos significativos se indican con $*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $***p < 0.0005$ y $****p < 0.0001$.

7.5. Características de Migración, Invasión y Adhesión en Células CD44std y CD44v9 en Comparación con las Células SNU-423

Dado que las CSC a menudo presentan características metastásicas, evaluamos la expresión de marcadores de EMT, como la vimentina y la N-cadherina (marcadores mesenquimales) y la E-cadherina (marcador epitelial), en células SNU-423, CD44std y CD44v9 mediante WB (**Fig. 10A**). Observamos que tanto la N-cadherina como la vimentina se expresó en células SNU-423. Además, la N-cadherina se expresó en células CD44std y, principalmente, la vimentina se expresó en células CD44v9. Sin embargo, la E-cadherina se expresó en un grado similar en las células SNU-423, CD44std y CD44v9 sin diferencias significativas. También evaluamos las capacidades de migración, invasión y adhesión de estas subpoblaciones *in vitro*. Mediante un ensayo de cierre de herida demostramos que las células CD44std exhibieron una capacidad de migración significativamente mayor ($p < 0.005$ y $p < 0.0005$) en comparación con las células CD44v9. Así mismo, las células CD44std presentaban una cantidad significativa ($p < 0.05$) de células invasoras en las cámaras de Boyden recubiertas con Matrigel (**Fig. 10B y 10C**). En el ensayo de adhesión, las células CD44v9 mostraron una mayor capacidad para adherirse a placas recubiertas de fibronectina (**Fig. 10D**). Estos resultados indican que tanto las células CD44std como las células CD44v9 exhiben fenotipos mesenquimales con expresión diferencial de N-cadherina y vimentina. Funcionalmente, CD44std muestra mayores características de CSC invasivas y migratorias, mientras que las células CD44v9 exhibe capacidades de adhesión a fibronectina.

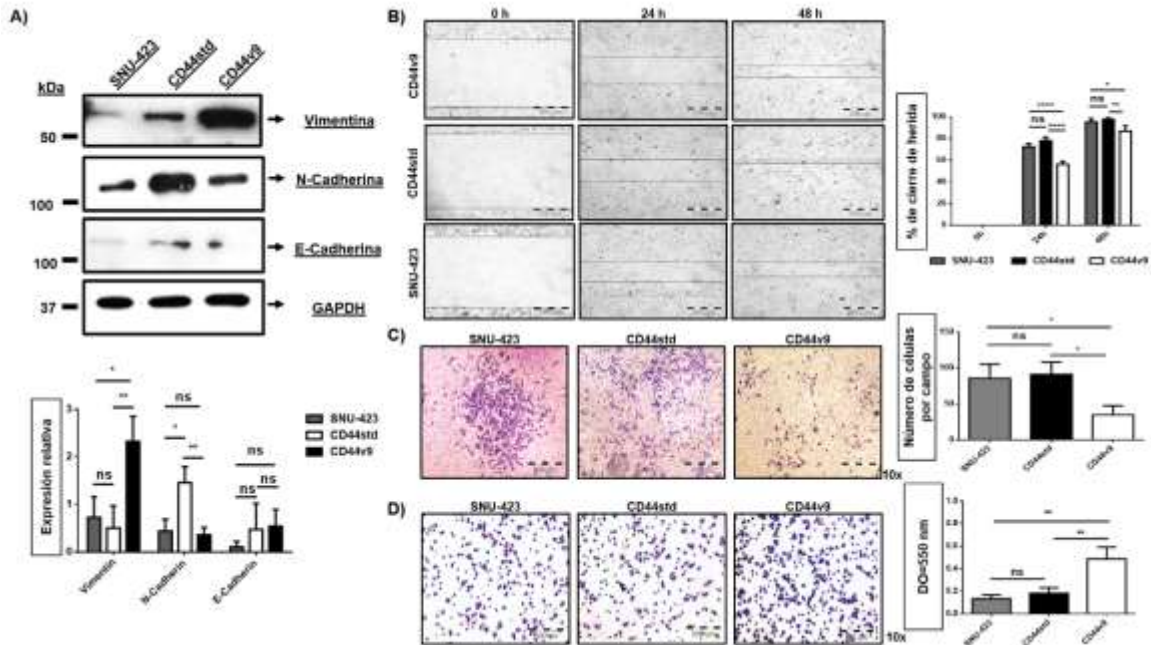


Figura 10. Expresión de Marcadores EMT y Evaluación de Migración, Invasión y Adhesión en Células SNU-423, sus Subpoblaciones CD44std y CD44v9. **A)** WB y densimetría de la expresión de vimentina, N-cadherina y E-cadherina en lisados de proteínas totales con GAPDH como control. **B)** Ensayo de cierre de heridas con fotografías representativas a las 0 h, 24 h y 48 h. Las barras de escala indican 200 μ m. **C)** Evaluación de la invasión utilizando una cámara Boyden con imágenes representativas (10x) a las 48 h. Las barras de escala indican 200 μ m. El número de células se contó en seis campos. **D)** Imágenes (10x) del ensayo de adhesión a fibronectina. Las barras de escala indican 200 μ m. Análisis densimétrico a 550 nm de células adheridas. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio \pm DE. Los datos significativos se indican con * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y **** $p < 0.0001$.

7.6. TGF- β Induce Cambios Morfológicos con la Expresión de CD44std y Disminución de CD44v9

Luego de generar subpoblaciones de CD44std y CD44v9 a partir de células SNU-423 mediante el uso de MACS, decidimos explorar los cambios que el TGF- β podía inducir en la morfología e isoformas de CD44 en estas subpoblaciones. Las células CD44std presentaban una morfología fusiforme, mientras que las células CD44v9 se observaba la presencia tanto de células poligonales, así como de células fusiformes. El tratamiento con TGF- β provocó que ambas subpoblaciones adoptaran una morfología predominantemente fusiforme (**Fig. 11A**). Al evaluar las poblaciones de CD44v9 mediante citometría de flujo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en CD44std, pero se apreció una disminución significativa ($p < 0.05$) en CD44v9 después del tratamiento con TGF- β (**Fig. 11B**). Para confirmar la identidad de las isoformas de CD44 expresadas en las subpoblaciones CD44v9- y CD44v9+ después del tratamiento con TGF- β , realizamos un análisis de WB utilizando un anticuerpo anti-CD44 panespecífico. En las células CD44std se observó una disminución de la expresión de CD44std y una baja expresión de CD44v. Por otro lado, las células CD44v9 mostraron un aumento significativo ($p < 0.005$) de la expresión de CD44std y disminución de CD44v (**Fig. 11C**). Estos hallazgos muestran que el tratamiento con TGF- β modifica la morfología de ambas subpoblaciones hacia una forma predominantemente fusiforme y conduce a una disminución de la subpoblación CD44v9, lo cual favorece la prevalencia de CD44std de las subpoblaciones celulares CD44std y CD44v9.

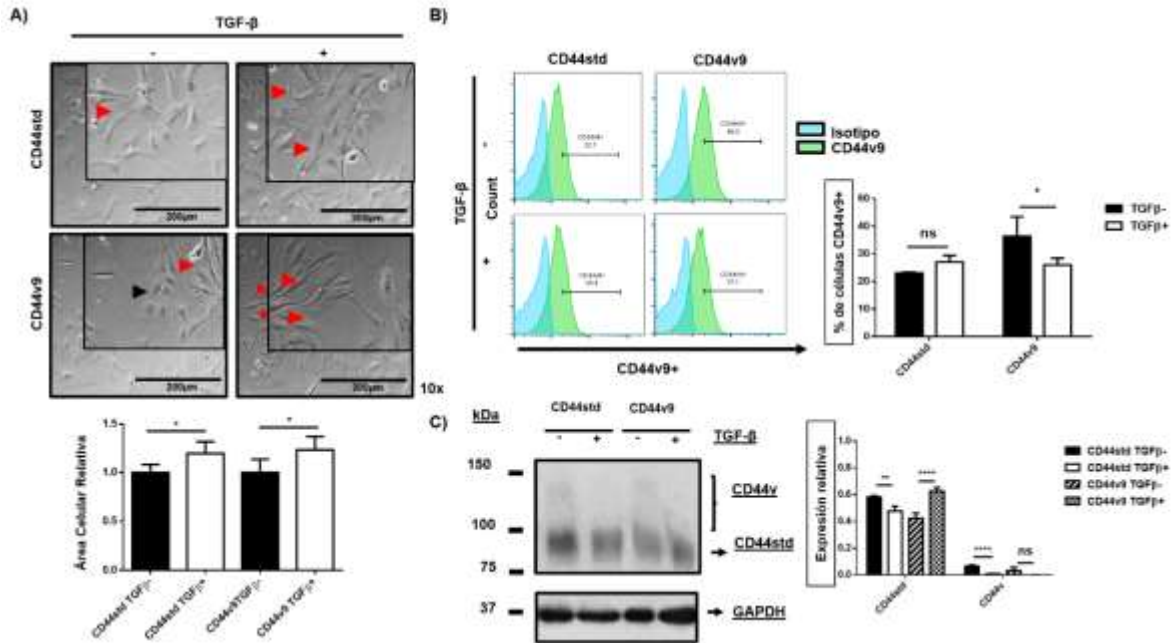


Figura 11. Efecto de TGF-β sobre Modificaciones Morfológicas y Cambios de Expresión CD44std y CD44v9 en Subpoblaciones. A) Se observan cambios en la morfología de las subpoblaciones de CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF-β. Las células CD44std muestran una morfología predominantemente fusiforme, mientras que en CD44v9 se observan células con morfología poligonal y fusiforme. **B)** Porcentaje de células CD44v9+ en células CD44std y CD44v9, antes y después del tratamiento con TGF-β. **C)** WB y densitometría de la expresión de las isoformas de CD44 en CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF-β. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con el promedio ± DE. Los datos significativos se indican con * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

7.7. TGF- β Intercambia los Rasgos de CSC (Clonogenicidad y Esferoides) en CD44std y CD44v9

Con el propósito de explorar como el TGF- β modifica las características de CSC en las subpoblaciones CD44std y CD44v9, evaluamos los factores de transcripción asociados con la troncalidad en ellas por WB (**Fig. 12A**). Tras el tratamiento con TGF- β ambas subpoblaciones no mostraron la expresión de Oct4. No obstante se detectó la expresión de Sox2 y Nanog en ambas subpoblaciones. Además, Nanog mantuvo su expresión sin cambios en células CD44std, pero dejó de expresarse en CD44v9. Mientras que Sox2 aumentó su expresión en células CD44std y se mantuvo sin cambios en CD44v9 posterior a TGF- β . A continuación, evaluamos la capacidad de autorenovación *in vitro* de las CSC mediante ensayos de clonogenicidad y formación de esferoides. En este contexto las células CD44std mostraron capacidades significativas ($p < 0.05$, $p < 0.005$ y $p < 0.0001$) de formación de colonias y esferoides en comparación con las células CD44v9 al tratarse con TGF- β (**Fig. 12B y 12C**). Estos resultados muestran un intercambio de los rasgos de CSC posterior al tratamiento con TGF- β en las células CD44std y CD44v9.

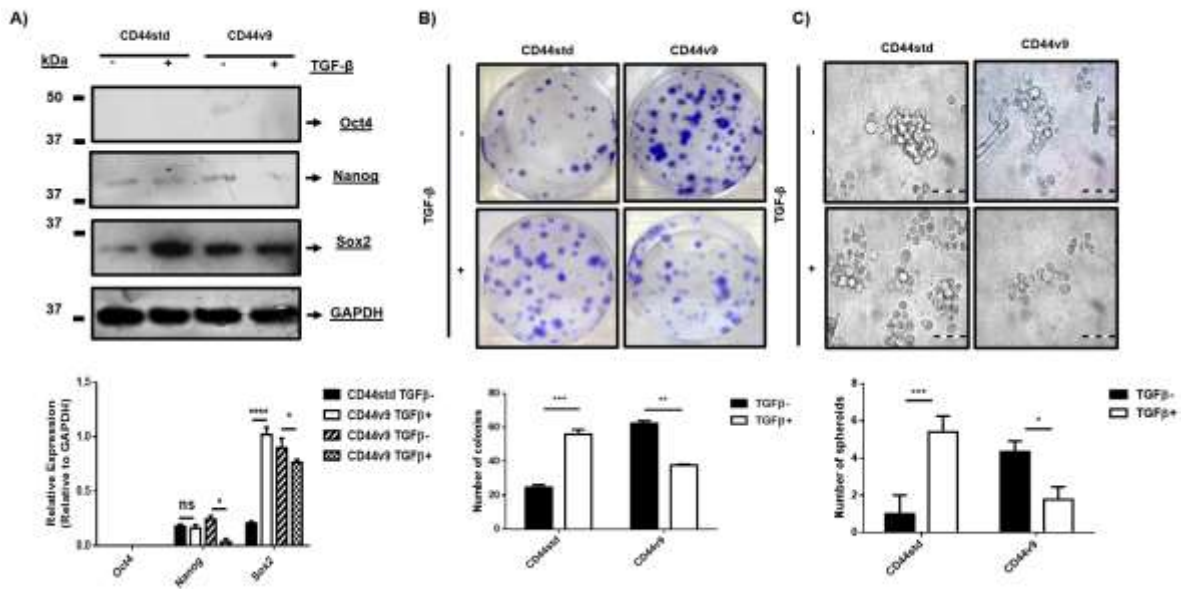


Figura 12. Efecto de TGF-β sobre la Expresión de Factores de Transcripción CSC y Evaluación de la Formación de Colonias y Esferoides en Células SNU-423 y en sus Subpoblaciones CD44std y CD44v9. A) El WB muestra la expresión de Oct4, Nanog y Sox2 y se incluyen densitometría de lisados de proteínas totales utilizando GAPDH como control. **B)** El ensayo de formación de colonias se presenta un gráfico que muestra el número de colonias formadas. **C)** Se muestran micrografías (40x) de esferoides junto con un gráfico que muestra el número de esferoides formados. Las barras de escala indican 100 μm. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio ± DE. Los datos significativos se indican con * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y **** $p < 0.0001$.

7.8. TGF- β Potencia el Fenotipo Mesenquimal, Invasión y Migración (CD44std) y Adhesión (CD44v9)

De manera posterior, revisamos los cambios en las características de la EMT inducidos por la exposición al TGF- β en las células CD44std y CD44v9, se evaluó la expresión de marcadores de EMT (vimentina, N-cadherina y E-cadherina) mediante WB. Observamos que después del tratamiento con TGF- β , hubo un aumento significativo ($p < 0.0005$ y $p < 0.05$) de la expresión de vimentina y N-cadherina, así como una disminución de E-cadherina en CD44std y CD44v9 (**Fig. 13A**). Al evaluar la funcionalidad de estos cambios en el proceso de cierre de herida e invasión, vemos que después de TGF- β , CD44std mostraron de manera significativa un mayor potencial migratorio ($p < 0.0005$ y $p < 0.05$) e invasivo ($p < 0.005$) en comparación a CD44v9 (**Fig. 13B y 13C**). Por otro lado, TGF- β aumentó la capacidad adhesiva en las células CD44v9 de manera significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$) en comparación con CD44std (**Fig. 13D**). Estos datos indican que el TGF- β dirige una transición hacia un fenotipo mesenquimal en las células CD44std y CD44v9, con una potenciación de la invasión y la migración en CD44std, y promueve la adhesión en CD44v9.

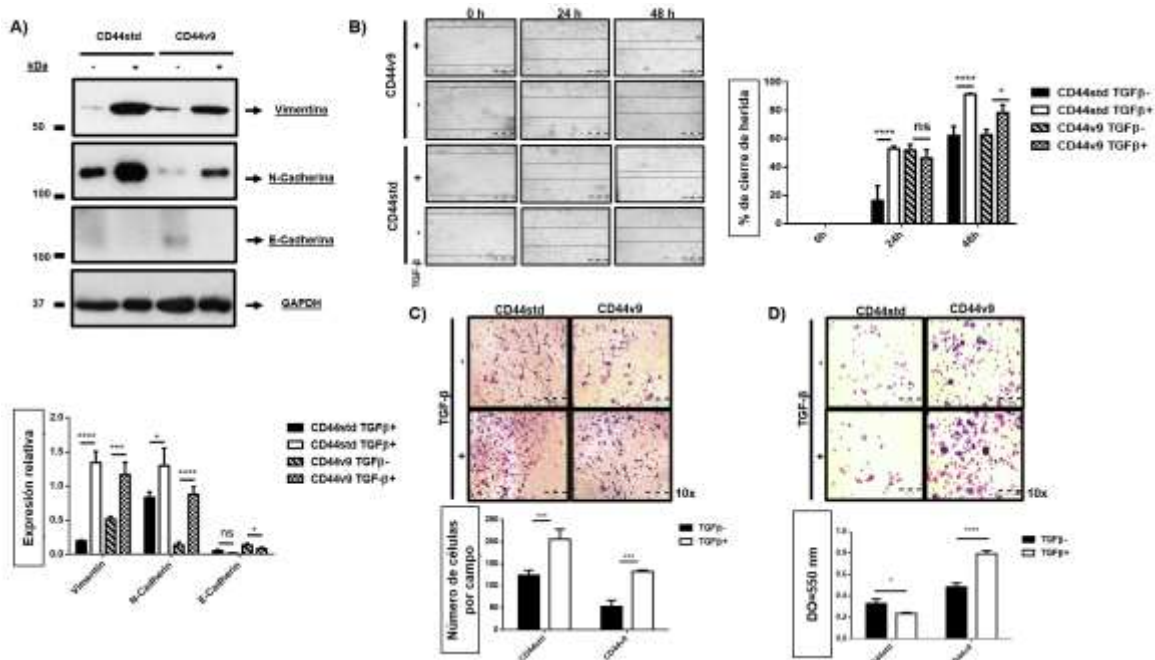


Figura 13. Efecto de TGF- β en la Expresión de Marcadores EMT y Evaluación de Migración, Invasión y Adhesión en Células SNU-423, sus subpoblaciones CD44std y CD44v9. **A)** WB y densitometría de la expresión de vimentina, N-cadherina y E-cadherina en lisados de proteínas totales con GAPDH como control. **B)** Ensayo de cicatrización de heridas con fotografías representativas a las 0 h, 24 h y 48 h. Las barras de escala indican 200 μ m. **C)** Evaluación de la invasión utilizando una cámara Boyden con imágenes representativas (10x) a las 48 h. Las barras de escala indican 200 μ m. Se contaron las células en seis campos. **D)** Imágenes (aumento de 10x) de la prueba de adhesión a la fibronectina. Las barras de escala indican 200 μ m. Análisis densimétrico a 550 nm de células adheridas. Todas las Imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio \pm DE. Los datos significativos se indican con * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0001$.

7.9. Análisis Proteómico de la Regulación de CD44std y CD44v9 en Diferentes Vías Biológicas

Como resultado cuantitativo del análisis proteómico; 967,807 péptidos fueron detectados en este estudio, y 66 % de estos péptidos tuvieron un máximo de ± 10 ppm. Un análisis completo a nivel de péptido mostró un ajuste adecuado en términos de calibración, operabilidad de fuente de iones, y efectividad enzimática (**Anexo 3**). Posteriormente, se analizaron las cuatro condiciones con y sin estímulo para las subpoblaciones de CD44std y CD44v9 tanto con o sin estímulo de TGF- β . Con el objetivo de evaluar el efecto de la estimulación y los cambios en el fenotipo inducidos por TGF- β . A partir de 11,305 proteínas cuantificadas compartidas entre ambas condiciones sin tratamiento (NT) y tratadas con TGF- β (T). Se aplicaron filtros a las proteínas cuantificadas (CV<0.30, al menos dos péptidos por proteína, considerando al menos un péptido único, proteínas que replicaron solo 3/3 y valor de p del ANOVA fue $p < 0.05$); además, se descartaron las proteínas “invertidas”. A través de un volcano plot se dispersaron las proteínas usando un punto de corte de 1, expresado en logaritmo base 2 (log₂) para identificar proteínas sobrerreguladas (UP) y subreguladas (DOWN). En CD44std, después de la exposición a TGF- β se identificaron 398, proteínas UP, 109 proteínas DOWN y 3,830 proteínas sin cambios. Mientras que en CD44v9, después del tratamiento con TGF- β se encontraron 147 proteínas UP, 238 proteínas DOWN y 3,745 proteínas sin cambios (**Anexo 3**). El análisis de expresión diferencial fue realizado mediante mapas de calor (heatmap), los cuales revelaron la formación de cuatro cuadrantes distintos en términos de abundancia de proteínas, lo que indica marcadas diferencias en el perfil de expresión de proteínas entre CD44std NT vs CD44std TGF- β y CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β (**Anexo 4**). También se muestra una lista del top 50 de proteínas diferenciales expresadas en CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β del heatmap (**Anexo 5 y 6**). Además, se analizó la expresión diferencial de proteínas UP y DOWN en 507 proteínas CD44std NT vs CD44std TGF- β y 385 proteínas en CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β a través de STRING. Los resultados muestran que

estas proteínas participan en 62 y 25 vías biológicas significativas en Reactome Pathways respectivamente en CD44std y CD44v9 después de la exposición a TGF- β (**Figura 14**). Varias de estas vías biológicas presentan un FDR <0.05 e incluyen vías importantes como la señalización de Rho GTPasas, transporte mediado por vesículas, ciclo celular y sistema inmunológico, de entre otros en CD44std. Mientras en CD44v9, las vías biológicas más afectadas están relacionadas principalmente con la guía de axones, fagocitosis dependiente de receptor FC gamma (FCGR), sistema inmune innato y fagocitosis mediada por FCGR3A, entre otros. Estos datos nos revelan diferencias significativas (FDR $p < 0.05$ en las vías biológicas afectadas de manera diferencial en las subpoblaciones CD44std y CD44v9 posterior a TGF- β .

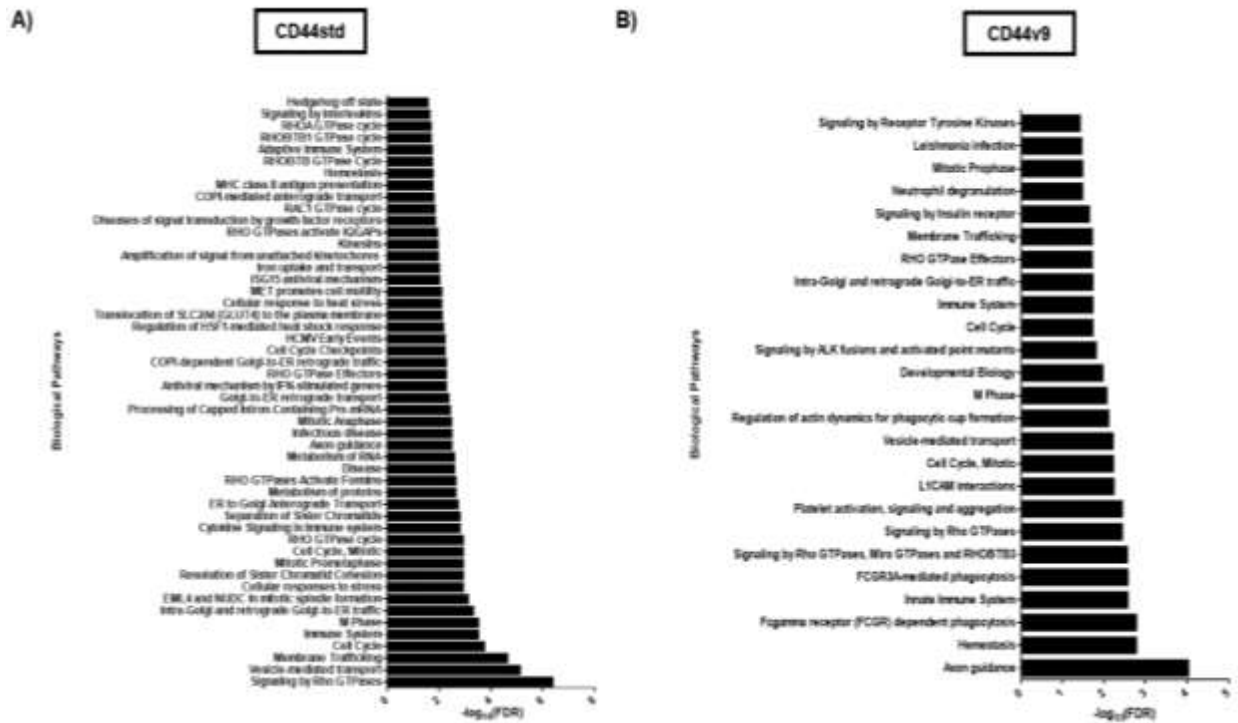


Figura 14. Rutas del Reactome en CD44std y CD44v9 Después de TGF- β . A) y B) Se muestra las proteínas cuya expresión cambió de manera significativa 62 (CD44std) y 25 (CD44v9) vías biológicas con FDR < 0,05. Los gráficos de barras muestran las 30 vías biológicas principales. Los valores FDR se transformaron utilizando el logaritmo de base 10 negativo, donde los valores más largos del eje de la abscisa indican una mejor representación de las vías.

7.10. TGF- β Genera una Señalización Diferencial en la Vía de MAPK de CD44std y CD44v9

Con base a los cambios observados en los rasgos de CSC en CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β , nos preguntamos qué señalización estaría presente en estas subpoblaciones. Para investigarlo, evaluamos la presencia de proteínas exclusivas en CD44std y CD44v9, utilizando un diagrama de Venn de las proteínas filtradas de CD44std NT vs CD44std TGF- β (4,337 proteínas) y CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β (4,130 proteínas), se eliminaron 4,108 proteínas compartidas entre ambas condiciones. Encontramos 229 proteínas exclusivas para CD44std y 22 proteínas para CD44v9 NT. Esto se sumó a las proteínas cuya expresión cambió UP and DOWN 507 proteínas en CD44std y 385 proteínas en CD44v9, resultando en 736 proteínas en CD44std y 407 en CD44v9 después del tratamiento con TGF- β (**Anexo 4**). Estas proteínas fueron analizadas en GO (ontología génica), para evaluar procesos biológicos y participación en la señalización (**Anexo 5 y 6**). En CD44std después del tratamiento con TGF- β , encontramos 58 proteínas que fueron analizadas en STRING y de acuerdo con KEGG muchas de estas proteínas están relacionadas con la regulación de proteínas como ARHGEF11 (DOWN), MAPK3 (UP), CHD8 (DOWN), PLCB2 (Exclusiva), PRKCA (UP), MAP2K7 (UP), MET (UP) y ITGA6 (DOWN). Estas proteínas están involucradas en diferentes vías importantes relacionadas con cáncer, ErbB, MAPK, PI3K-Akt, Wnt, VEGF y Ras de manera significativa ($p < 0.05$) (**Figura 15A**). Por otro lado, en CD44v9 después del tratamiento con TGF- β , encontramos 41 proteínas participantes en la señalización, estas incluyen 20 proteínas relacionadas a la transducción de señales intracelulares. Varias de estas proteínas están subreguladas como: NFKB2, PRKAA1, MAPK1, MAPK13, MAPK3, DUSP16, RAPGEF2 y RASGRP3. Además, la señalización de MAPK, Rap1, VEGF, regulación de células troncales, mTOR, Ras, y vías en cancerígenas como ErbB, TGF- β , PI3K-Akt y HIF-1 (**Figura 15B**). Al comparar las vías de señalización presentes en CD44std y CD44v9 después de la exposición a TGF- β , encontramos un denominador común en la vía de señalización de MAPK que

muestra un comportamiento de sobreregulación en CD44std (MAPK3, PRKCA, MAP2K7 y MET) y desregulación CD44v9 (NFkB2, MAPK1, MAPK3, MAPK13, DUSP16, RASGRP3 y RAPGEF2). En resumen, estos datos muestran un comportamiento diferencial en la vía de señalización de MAPK entre CD44std y CD44v9.

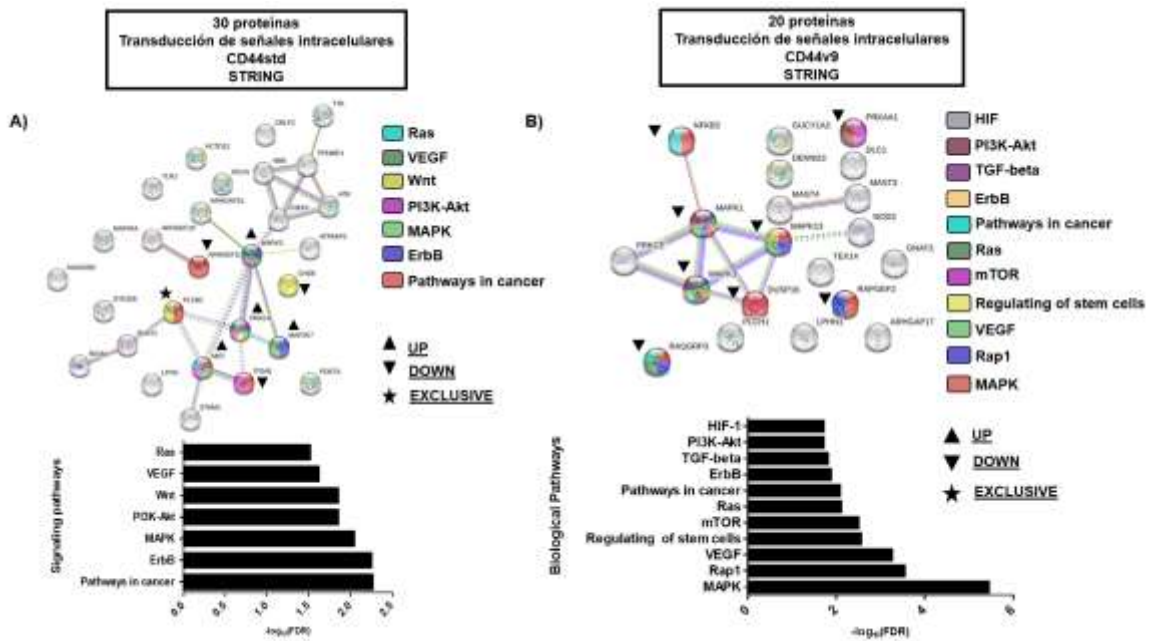


Figura 15. Análisis Proteómico de la Señalización en CD44std y CD44v9 Después del Tratamiento con TGF-β. **A)** Interactoma por STRING de CD44std después del tratamiento con TGF-β, se identificaron 30 proteínas involucradas en varias vías de señalización (RAS, VEGF, Wnt, PI3K-Akt, MAPK, ErbB y Vías en cáncer) donde la mayoría son proteínas UP (MAPK3, PRKCA, MAP2K7, MET), así como proteínas DOWN (ARHGEF11, CHD8 y ITGA6) y también se identificaron proteínas exclusivas (PLCB2) en esta interacción. **B)** Interactoma por STRING de CD44v9, después del tratamiento con TGF-β, se observaron 20 proteínas involucradas todas ellas reguladas negativamente DOWN (NFKB2, PRKAA1, MAPK1, MAPK3, MAPK13, DUSP16, RAPGEF2 y RASGRP3).

7.11. Validación de la Vía de Señalización Diferencial en la Vía de MAPK en CD44std y CD44v9 Posterior a TGF- β

Con el fin de confirmar la activación de la vía de señalización de MAPK en CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β , se realizó un análisis mediante WB para validar el eje de activación de los componentes clave de esta vía de señalización incluyendo Src, MEK, MAPK y p-MAPK (**Figura 16**). Los resultados revelaron que la expresión de Src, MEK, MAPK y p-MAPK se encuentra significativamente incrementada ($p < 0.05$ y $p < 0.005$) en CD44std después del tratamiento con TGF- β . En contraste, CD44v9 se observa una disminución de los efectores Src, MEK sin cambios en la expresión MAPK y un nivel reducido de fosforilación de MAPK después del tratamiento con TGF- β . Estos datos sugieren que los cambios observados en CD44std y CD44v9 seguido de TGF- β en relación con sus rasgos de CSC pueden ser dirigidos por un comportamiento diferencial en la vía de señalización de MAPK.

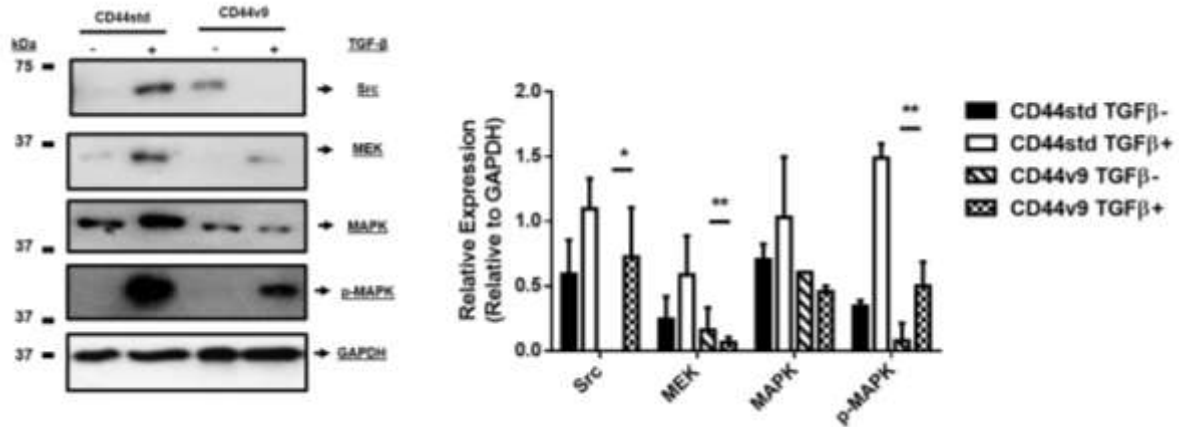


Figura 16. Validación de la señalización diferencial en MAPK en CD44std y CD44v9 después de TGF-β. WB de la expresión de Src, MEK, MAPK y p-MAPK y densitometría en lisados de proteínas totales utilizando GAPDH como control. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio \pm DE. Los datos significativos se indican con $*p < 0.05$ y $**p < 0.005$.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos del HCC obtenidos del TCGA, encontramos que las muestras de tumores tienen una alta expresión de CD44 en comparación con las muestras no tumorales. El análisis de la expresión de exones constantes, así como el análisis de los exones v8, v9 y v10, sugirió que la expresión de CD44std y CD44v8-10 puede estar presente en el cáncer de hígado. Para confirmar esta hipótesis, utilizamos la plataforma TSVdb y encontramos que CD44std se expresaba de manera significativa tanto en las muestras no tumorales como en las tumorales de hígado, sin diferencias discernibles entre ambas. Sin embargo, CD44v8-10 mostró diferencias claras en la expresión entre las muestras tumorales y no tumorales de hígado. Es importante señalar que otros estudios, como los relacionados con el cáncer de mama, el análisis de los exones ha sugerido que CD44std y CD44v podrían ser útiles para determinar el estado de las CSC [126]. Estos hallazgos resaltan la importancia de utilizar diversas plataformas para analizar tanto la expresión de exones como la expresión de isoformas de CD44 cuando se investigan las CSC y se plantea su presencia en muestras tumorales.

En el presente estudio, observamos altos niveles de expresión de CD44 en las células SNU-387 y SNU-423, lo cual coincide con estudios previos realizados en líneas celulares de HCC (SNU-354 y SNU-368) [119]. Además, reportamos por primera vez que tanto CD44std y CD44v se expresan en las células SNU-423 con la presencia de una subpoblación de CD44v9. CD44v10, una glicoproteína no metastásica que se une a la fibronectina en el cáncer de páncreas tiene un rango de peso molecular informado de 120-130 kDa [127]. Se ha informado que CD44v8-10 tiene un peso molecular de 150 kDa y es reconocido por los anticuerpos CD44v9 para detectar las CSC [101]. Por lo tanto, utilizamos este anticuerpo en experimentos posteriores para determinar la presencia de poblaciones CD44v9+ en las células SNU-387 y SNU-423. El anticuerpo CD44v9 (Clon: RV3) utilizado en el presente estudio se ha utilizado previamente para identificar y aislar las CSC en varios tipos de cáncer [83, 128, 129]. Sin embargo,

los informes sobre las isoformas de CD44 en las células cancerosas son limitados, ya que la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en CD44std y su potencial como marcador de las CSC. Si bien, un estudio reciente utilizó la tecnología CRISPR para mostrar la asociación de CD44std con rasgos de las CSC en HCC [84], pero no se utilizaron anticuerpos para determinar la presencia de las isoformas de CD44, lo cual podría otorgar a estas CSC funciones adicionales.

La investigación sobre las isoformas de CD44 y su relación con las CSC se ve limitada debido a la falta de anticuerpos específicos para identificar marcadores en HCC. Aquí, utilizamos con éxito el anticuerpo CD44v9 en conjunto con el sistema MACS para separar las células SNU-423 en una subpoblación CD44v9⁻ que expresa CD44std y una subpoblación CD44v9⁺ que expresa principalmente CD44v9. Otros autores han utilizado diferentes metodologías, como una combinación de anticuerpos CD44 pan-específico y CD44v9 en la línea celular de seres humanos de cáncer de vesícula biliar NOZ, para estudiar rasgos específicos de CSC [97]. En nuestro estudio demostramos que es posible evaluar las características de las CSC a través de únicamente el sistema MACS CD44v9, ya que ambas poblaciones aisladas mostraron una expresión exclusiva de isoformas de CD44 además de una expresión diferencial de factores de transcripción asociados con la troncalidad, y un comportamiento diferente en términos de formación de colonias y esferoides. Sin embargo, los resultados actuales indican la necesidad de aplicar este sistema MACS para CD44v9 en diversas líneas celulares y muestras de pacientes de HCC con el sistema de separación MACS CD44v9 para lograr un análisis más completo del papel de CD44v9.

Entre los factores de transcripción asociados a la troncalidad y la identidad de las CSC se encuentran Oct4, Nanog y Sox2. Nuestros resultados revelaron una expresión diferencial de estos factores. Se identificaron niveles bajos de expresión de Oct4 en ambas subpoblaciones. No obstante, Nanog solo estuvo presente en las células CD44std, mientras que Sox2 se detectó solo en las células CD44v9. Por lo tanto, estos hallazgos sugirieron que los rasgos de las CSC de estas subpoblaciones están relacionados con su potencial metastásico; Nanog y Sox2

promueven la transición epitelial-mesenquimal a través de la activación de NODAL/SMAD3 y Slug, respectivamente [130, 131]. Se requiere un análisis adicional para comprender mejor la relación entre los factores de transcripción asociados con la troncalidad y el potencial metastásico en las células CD44std y CD44v9. El presente estudio demostró que las células CD44v9 muestran una mayor capacidad de formación de colonias y esferoides en comparación con las células CD44std. Se llevaron a cabo xenotrasplante subcutáneo y ortotópico de las células SNU-423 y sus subpoblaciones en ratones SCID, con resultados negativos, ya que no se logró la formación de tumores (**Anexo 2**). Se ha descrito que las células SNU-423 son no tumorigénicas, pero sí altamente invasivas [132, 133]. Por lo tanto, es fundamental entender qué factores facilitan la iniciación del tumor y establecer un modelo de tumorigénesis para las células SNU-423 y sus subpoblaciones en modelos de ratón SCID, ya que la iniciación del tumor es una de las características indispensables de las CSC.

Se ha sugerido que entre las isoformas de CD44, CD44std es un componente esencial en la metástasis [60, 121]. En este estudio identificamos dos subpoblaciones con fenotipos mesenquimales distintos; la subpoblación CD44std presenta la expresión de N-cadherina y tiene un potencial migratorio e invasivo, mientras que la subpoblación CD44v9 tiene la expresión de la vimentina y un potencial adhesivo. Se ha informado que la vimentina es un marcador que enriquece las CSC [134], mientras que N-cadherina se ha relacionado en muestras de tejido con una alta expresión de CD13, otro marcador de CSC en HCC [135]. De manera similar, en el cáncer de vesícula biliar del ser humano se ha informado que las células CD44v9 con características de CSC coexisten, con las células CD44std que tienen un mayor potencial invasivo y migratorio [97]. Además, se ha demostrado que CD44 actúa como una molécula de adhesión que mejora la adhesión de la membrana al endotelio y la fibronectina dependiente de la integrina α -5 β 1 en el cáncer de mama basal [136], y CD44v puede actuar como un ligando activo para E-selectina [137]. Por lo cual es de interés, el análisis las capacidades adhesivas de las isoformas de CD44 en SNU-423.

Uno de los inductores de la EMT es el TGF- β , que promueve cambios en algunas de las características de las isoformas de CD44v a CD44std y viceversa, en varios tipos de cáncer [96, 105-107]. En este estudio hemos observado que las subpoblaciones de CD44std y CD44v9 disminuyen la expresión CD44v y mantienen CD44std con una morfología mesenquimal después de la exposición a TGF- β . Se ha informado que el TGF- β induce el cambio de isoforma de CD44v a CD44std mediante ESRP1 a través de la actividad de SMAD3/PCBP1, lo cual conlleva a un aumento de la migración, invasión e iniciación tumoral [96]. Esto podría ser un punto de partida para investigar elementos como ESRP1 o SMAD3/PCBP1 que podrían controlar el mecanismo de cambio de isoforma de CD44v a CD44std durante los cambios en los rasgos de las CSC mediados por TGF- β en el HCC.

Se ha informado que el TGF- β influye en CD44 total o CD44std con un aumento de las características de las CSC, la migración y la invasión durante la EMT [119, 138]. En nuestros resultados, encontramos que la subpoblación de CD44std no presenta cambios en la expresión de Nanog pero muestra un aumento en Sox2. En contraste, encontramos un aumento de Nanog, pero no hay cambios en Sox2 en las células CD44v9. Estas diferencias en la expresión entre Nanog y Sox2 resultaron en una mayor formación de colonias y esferoides en la subpoblación de CD44std en comparación con CD44v9 después del tratamiento con TGF- β . En varios tipos de cáncer se ha estudiado la relación de cómo el TGF- β modifica las características de las CSC. En el cáncer de mama, el tratamiento con TGF- β se ha asociado con un aumento en la expresión de Oct4, Nanog y marcadores mesenquimales en las CSC [139]. En estudios donde Slug, un efector de TGF- β , fue silenciado, se inhibió la expresión de Nanog y Sox2 *in vivo* en HCC [140]. Además, se ha revelado que el TGF- β aumenta la expresión de CD44 e induce la EMT a través del eje de señalización AKT/GSK3- β / β -catenina con un fenotipo de CSC en HCC [119]. Esto podría explicar cómo TGF- β regula al alza los factores de transcripción asociados a la troncalidad y su estado como CSC en las subpoblaciones de CD44std y CD44v9. Por lo tanto, es importante considerar el silenciamiento de Nanog o Sox2 en las subpoblaciones de CD44std y CD44v9

después del tratamiento con TGF- β para evaluar las vías de señalización AKT, Hedgehog o Wnt relacionadas con la identidad de las CSC y determinar la relación entre CD44std y CD44v9 con el estado de las CSC después del efecto del TGF- β .

Como era de esperar, observamos un aumento en los niveles de N-cadherina y vimentina en las células CD44std y CD44v9, lo cual se asocia con un comportamiento migratorio e invasivo durante la inducción de TGF- β . También observamos, que la adhesión a la fibronectina se ve potenciada en las células CD44v9 después de la exposición a TGF- β . Otros componentes de la EMT, como Twist o Snail, podrían estar involucrados en los cambios mediados por TGF- β . Se ha demostrado que la sobreexpresión de Twist conduce a la adquisición de características de las CSC [22]. De manera similar, la eliminación de Snail induce la EMT, y aumenta la formación de esferoides en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello [141]. Esto sugiere que estos componentes de la EMT podrían contribuir a la adquisición de rasgos de CSC en las células CD44std después del tratamiento con TGF- β . La adhesión a la fibronectina por parte de las isoformas de CD44 en presencia de TGF- β no había sido informada previamente. En la literatura, se ha informado que el TGF- β induce la colocalización de HA y fibronectina en miofibroblastos [142]. En las CSC, HA es un ligando para las isoformas de CD44. Posiblemente, esto implicaría una relación entre las isoformas de CD44, la síntesis de HA y el aumento de la adhesión a la fibronectina mediada por TGF- β .

La proteómica añade varias posibilidades en cuanto al análisis de los cambios observados en el comportamiento de las células CD44std NT vs CD44std TGF- β y CD44v9 NT vs CD44v9 TGF- β . En este trabajo, identificamos proteínas relacionadas en la vía de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La señalización por MAPK permite a las células responder a una variedad de señales, incluyendo el daño por genotóxicos al DNA, citocinas inflamatorias, y estímulos celulares. Esta señalización se divide en tres compartimentos conocidos como RAS= MAPKKK, MEK= MAPKK y ERK= MAPK. Una vez activadas estas proteínas desencadenan una señalización río abajo de la

fosforilación de proteínas y factores de transcripción [143]. Posterior al tratamiento con TGF- β , observamos una señalización sobrerregulada de MAPK en CD44std a través de las proteínas, PRKCA, MAP2K7, MET y MAPK3. Estas proteínas participan de la siguiente manera en la progresión del cáncer:

PRKCA regula la proliferación, diferenciación y tumorigénesis con efectos variables según el contexto. En la progresión celular y tumoral, puede promover la señalización; en otros cánceres o inducir el arresto y la supresión. En cáncer de hígado, estimula el crecimiento, y su inhibición con anti-sentido reduce el crecimiento al desregular p21, mientras que en las células HepG2, inhibe crecimiento a través de una vía independiente de MEK/ERK [144, 145]. PKCA parece actuar sensorialmente, fomentar o atenuar según el entorno. La sobrerregulación de PRKCA en células CD44std después de la exposición a TGF- β , podría indicar su papel en la proliferación en este contexto y en línea con la literatura existente.

MAP2K7 o MEK activa específicamente JNK1 y JNK2, estas cinasas son fosforiladas y activadas por MEKK1, MEKK2, MEKK5 y GCK. Responden a la transducción de señales mediando la respuesta proinflamatoria a citocinas y estrés celular [146]. Se ha reportado que una isoforma de MAP2K7 dirige una desdiferenciación en células tumorales con baja expresión de MBNL1, a través de JNK [147]. Estos datos sugieren que la señalización sostenida de JNK en CD44std podrían asociarse con la ganancia de rasgos de CSC.

MET (c-MET) este receptor desempeña un papel crucial en la transmisión de señales desde el entorno extracelular al interior de la célula. Su activación ocurre cuando se une a su ligando el HGF tras la unión a su ligando, se asocia con diversas proteínas como PIK3R1, PLCG1, SRC, GRB2, STAT3 y GAB1, su activación anormal, como protooncogén, impulsa el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer [148]. Sus vías de activación incluyen PI3K/AKT, JAK/STAT, Ras/MAPK y SRC. MET se autofosforila y recluta proteínas, como Grb2 y GEF y como SOS, lo que a su vez activa a Ras y desencadena cascadas de señalización como Raf, MEK, MAPKs, ERK, JNK y p38. Estas señales activan

factores de transcripción como Elk, Ets1 y c-Myc, e impulsa la proliferación tumoral, invasión, metástasis, la resistencia a la apoptosis, la EMT y la angiogénesis [149]. Dada la evidencia previa de una señalización sostenida de MET en cáncer, es plausible que este podría ser un blanco potencial para la sobreexpresión con el fin de potenciar la tumorigénesis en SNU-423 o sus subpoblaciones (CD44std y CD44v9).

Por otro lado, la subregulación de las proteínas CD44v9 en la señalización de MAPK (NFKB2, MAPK1, MAPK13, MAPK3, DUSP16, RAPGEF2 y RASGRP3). Las siguientes proteínas serán discutidas en los siguientes apartados.

NFKB2 o p52 es un factor de transcripción presente en todas las células, y desempeña un papel clave en diversas respuestas biológicas como inflamación, inmunidad, crecimiento, apoptosis y desarrollo de tumores. En el proceso de tumorigénesis, agrava la inflamación intestinal a través de RelA, la infiltración y el daño en el colon, contribuyendo al desarrollo de cáncer [150]. Además, se ha observado que está sobreexpresada en cáncer de próstata [150]. En colaboración con RelB, regula la expresión de genes como *ciclina D1*, *Bcl-xL*, *cd44*, *cxcl12* e *inf-β* [151]. La desregulación de estos genes podría afectar las vías biológicas subreguladas en células CD44v9 por medio de señalización de MAPK por TGF-β.

MAPK1 o ERK2 es una cinasa treonina/serina que forma parte de la vía de señalización MAPK, y actúa en conjunto con ERK1. Se ha observado que ERK2 influye en la división celular en hepatocitos y en células epiteliales mamarias induce la EMT, a diferencia de ERK1 [144, 152]. Además, se ha vinculado la señalización del EGFR con la promoción de células tumorales, mientras que la señalización del c-MET depende de la participación de ERK2, lo que establece una comunicación bidireccional a través del estroma tumoral [153]. Teniendo en cuenta el papel específico que ERK2, se puede sospechar que su desregulación inducida por TGF-β tenga una implicación en la adquisición en los rasgos de CSC.

MAPK13 o p38δ es una de las cuatro isoformas de la cinasa p38 MAPK. Esta isoforma juega un papel en las cascadas de respuestas celulares a estímulos como las citocinas proinflamatorias o el estrés físico activado por MAP2K6 o

MAP2K3 [154]. Esta activación se asoció con la transformación maligna y cáncer, que incluyen procesos como la proliferación, invasión, migración y apoptosis. Aun así, MAPK13 puede actuar como supresor o promotor de tumores [155]. En el caso de HCC, la inhibición de MAPK13 disminuye el crecimiento clonogénico y aumenta la resistencia a tratamientos en comparación con Sorafenib [156]. Estos resultados están en línea con la disminución de la capacidad clonogénica que observamos en las células CD44v9 después del tratamiento con TGF- β .

DUSP16 es una proteína de fosfatasa dual que inactiva las MAPK, incluyendo p38 y JNK. Se cree que la desactivación de JNK por DUSP16 podría ser un mecanismo implicado en varios tipos de cáncer [157]. En células de cáncer de ovario, por ejemplo TGF- β aumenta la señalización de MAPK, afecta DUSP16 y al reducir su expresión, desencadena la EMT [158]. En el caso del HCC, la pérdida de DUSP16 activa p53 y Rb, e induce senescencia celular. Pero en pacientes con HCC, esta pérdida se asocia con una mayor proliferación tumoral [159, 160]. Esto sugiere que la desregulación de DUSP16 podría reducir las células CD44v9 debido a la señalización continua de MAPK a través de TGF- β .

RAPGEF2 es un factor que modifica la guanina en las GTPasas de cambio de guanina para Rap, activando Rap2 y reprimiendo YAP y TAZ para controlar las actividades celulares ante estímulos mecánicos. Recientemente, en el contexto del HCC, RAPGEF2 y genes similares predicen pronóstico y la respuesta a la inmunoterapia [161]. El tratamiento con TGF- β desregula múltiples vías de señalización, especialmente en las células CD44v9, donde el papel de RAPGEF2 podría desempeñar un papel en el microambiente inmune tumoral.

RASGRP3 o proteína de liberación del nucleótido de guanina a RAS 3, regula el intercambio de GDP por GTP en las GTPasas pequeñas de RAS, actuando río abajo de c-MET o EGFR [162]. La desregulación de RASGRP3 en cáncer de mama ha demostrado reducir la proliferación y aumentar la apoptosis, y afectar señales como Akt, ERK 1/2 y el receptor de estrógenos [163]. Estos hallazgos respaldan informes previos, donde la inhibición de RASGRP3 en células de cáncer de próstata afecta la proliferación y la formación de esferoides [164]. La

desregulación de RASGRP3 inducida por el tratamiento por TGF- β podría ser un objetivo que considerar, para aumentar características de las CSC en SNU-423 y subpoblaciones.

Curiosamente, MAPK3 parece ser un punto de convergencia en relación con la sobrerregulación y desregulación observada en las subpoblaciones CD44std y CD44v9 después de la exposición al TGF- β . Esto podría convertirlo en un objetivo de interés para la regulación tanto en SNU-423 como en las subpoblaciones mencionadas. En este punto, discutiremos el valor de MAPK3, o más específicamente, la señalización de ERK1/2, su asociación con el cáncer y su efecto a través de TGF- β .

MAPK3, también conocido como ERK1, es una cinasa activada río abajo de los receptores de TKR en conjunto con ERK2. Aunque no se han realizado estudios independientes y específicos sobre ERK1, parece ser que hay una relación cercana con ERK1/2 la cual discutiremos a continuación. La activación de ERK1/2 resulta de la señalización de RAS, RAF y MEK, lo que activa procesos como proliferación, diferenciación, ciclo celular y formación tumoral. ERK1/2 activa proteínas como c-Myc, survivina, ciclina D1, metaloproteinasas y Bcl-2 [143]. La sobreexpresión de ERK1/2 conduce a una proliferación descontrolada e inhibe la apoptosis en varios tipos de cáncer [165]. En el HCC, alrededor del 50% de los pacientes mantienen una señalización continua de MAPK, que resulta de la sobreexpresión de factores de crecimiento río arriba y receptores (HGF y FGF), y/o de la subregulación de reguladores negativos (RAS-GAP) o moduladores positivos (RAS-GEF) de ERK1/2 [166]. La inhibición de ERK1/2 puede interrumpir la proliferación, promover apoptosis y la diferenciación, lo que limita la formación de tumores [167]. En relación con la señalización con TGF- β , esta comunicación cruzada parece ser esencial para una EMT completa, a través de una retroalimentación positiva mediada por la señalización autocrina de TGF- β . Este mecanismo implica la fosforilación de coactivadores de SMADs por ERKs o la fosforilación de SMAD2/3 por ERKs [168]. En este contexto, podemos plantear la hipótesis de que el tratamiento con TGF- β , junto con su señalización y

comunicación cruzada con MAPK, dirija el proceso de EMT en el contexto de las isoformas de CD44, con la adquisición o pérdida de características CSC. Estos reportes sobre la subregulación y sobrerregulación de ERK1/2, son consistentes con nuestros resultados donde observamos los cambios presentes en células CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β . Sin embargo, es de resaltar que no hay reportes que asocien la señalización diferencial de MAPK con relación a isoformas de CD44. Este conjunto de proteínas con relación a cada subpoblación presenta varios blancos activos que podrían contribuir a la ganancia o pérdida de rasgos de CSC.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo, hemos identificado subpoblaciones de CD44std y CD44v9 con rasgos diferenciales de CSC, y hemos observado como TGF- β afecta estas poblaciones.

- Las células CD44std muestran una expresión aumentada de marcadores como Nanog y N-cadherina que son rasgos presentes en las CSC relacionados con migración e invasión, después del tratamiento con el TGF- β se incrementa la capacidad de formación clonogénica y esferoides en conjunto con la migración e invasión.
- Las células CD44v9 muestran una expresión elevada de Sox2 y Vimentina con rasgos de formación de colonias y esferoides. Sin embargo, después del tratamiento con el TGF- β estos rasgos disminuyen, y la adhesión celular se ve potenciada.
- La señalización de la vía MAPK se encuentra sobrerregulada en CD44std, y subregulada en CD44v9 después del tratamiento por TGF- β .
- Estos resultados subrayan la importancia del análisis proteómico para discernir la actividad diferencial de la vía de señalización MAPK en las subpoblaciones CD44std y CD44v9.

Las diversas proteínas en la vía MAPK identificadas en este estudio podrían servir como objetivos para futuras investigaciones, lo que arrojaría luz sobre cómo estas proteínas podrían modular las características de CSC de estas subpoblaciones y su papel en la progresión del HCC.

10. PERSPECTIVAS

Aquí se presentan algunas perspectivas y áreas de investigación futuras que pueden derivarse de este estudio.

- Evaluar la expresión de las isoformas CD44std y CD44v9 en muestras de HCC para confirmar si nuestros hallazgos en líneas celulares se reflejan en pacientes.
- Realizar experimentos para silenciar específicamente las isoformas de CD44std y CD44v9 en SNU423, así como en otras líneas celulares del HCC. Para entender su función en el cáncer hepático.
- Explorar otros modelos experimentales que investigan el papel de las isoformas de CD44 en las CSC y cómo afectan la progresión del cáncer.
- Investigar cómo factores de microambiente pueden influir en la capacidad tumorigénica de las células CD44v9- y CD44v9+ en modelos de ratones inmunodeficientes.
- Estudiar las vías de señalización relacionadas con CSC (Wnt, Hedgehog, Notch) en las células CD44v9- y CD44v9+ después del tratamiento con TGF- β .
- Estudiar el efecto de la inhibición de la señalización de MAPK, utilizando un inhibidor como PD98059 después del tratamiento con TGF- β y cómo afecta las células CD44.
- Investigar el papel de correceptores que podrían facilitar la capacidad tumorigénica después del tratamiento con TGF- β , como el receptor c-Met.

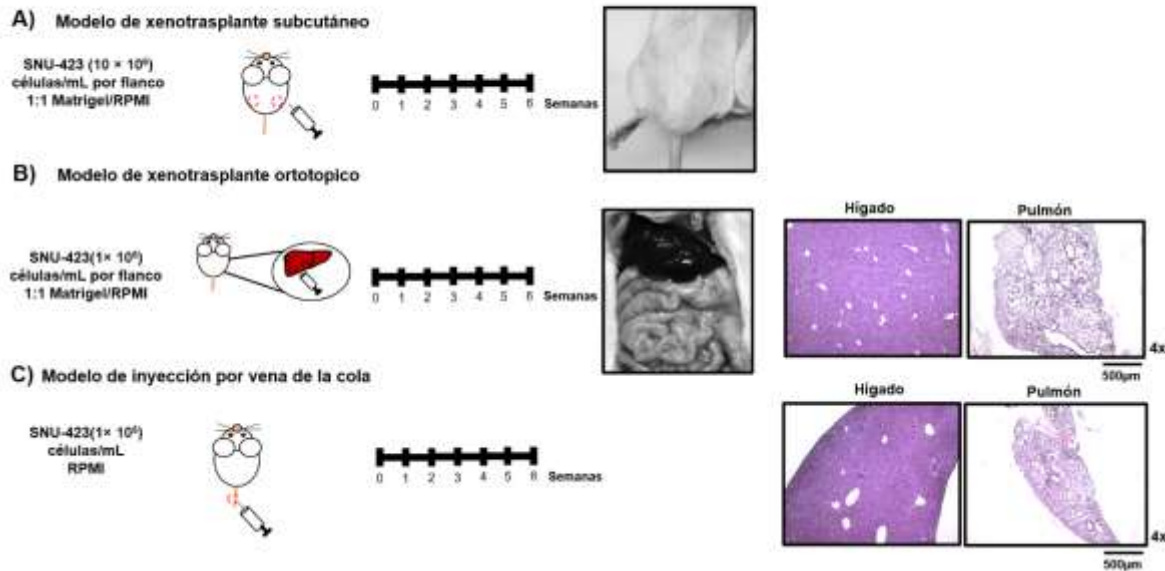
Estas perspectivas abren nuevas investigaciones para comprender mejor la influencia de las isoformas de CD44 y otros factores en las CSC y la progresión del HCC

12. ANEXOS

Anexo 1. Lista de anticuerpos donde se especifica la marca, bloqueo y protocolo de incubación en orden de aparición en este trabajo.

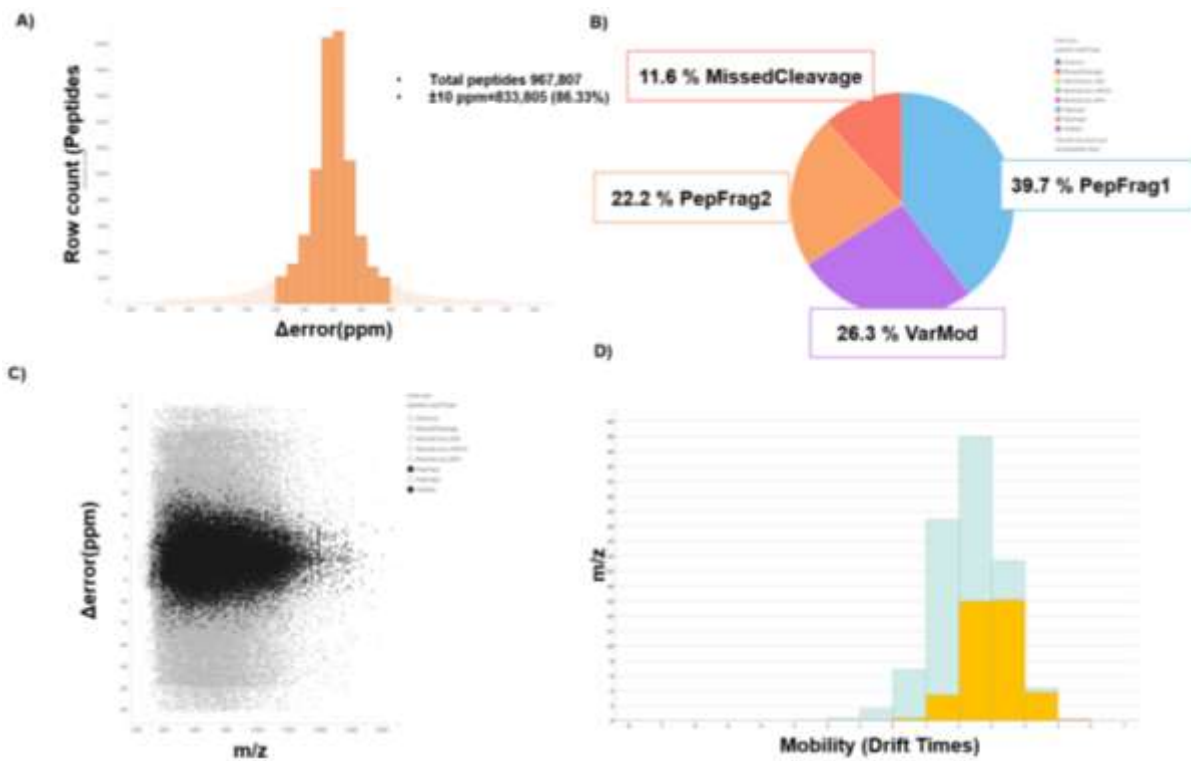
Anticuerpo	Diluido	Bloqueo	Ab 1rio	Ab 2rio
α-CD44 Abcam (ab189524)	TBS 1x Tween 0.05%	Leche al 5 % 1 h	1:8,000 Leche al 5%	1:25,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-GAPDH Cell Signaling Technology (14C10)	TBS 1x Tween 0.1%	Leche 3 % BSA 1 % 1 h	1:10,000 BSA 1%	1:10,000 α-Ratón HRP 1h TA Leche 3 % BSA 1 %
α-Oct4 Cell Signaling Technology (C30A3)	PBS 1x Tween 0.05%	Leche al 5 % 1 h	1:1,000 Leche al 5%	1:5,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-Sox2 Cell Signaling Technology (D6D9)	PBS 1x Tween 0.05%	Leche al 5 % 1 h	1:500 Leche al 5%	1:5,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-Nanog Cell Signaling Technology	PBS 1x Tween 0.05%	Leche al 5 % 1 h	1:500 Leche al 5%	1:5,000 α-Conejo HRP 1h TA

(D73G4)				
α-Vimentina (V9) Sc-6260	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:1,000 Leche al 5 %	1:10,000 α-Ratón HRP 1h TA
α-E-cadherina (67A4) Sc-21791	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:250 Leche al 3%	1:2,000 α-Ratón HRP 1h TA
α-N- Cadherina (13A9)	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:1,000 Leche al 5 %	1:10,000 α-Ratón HRP 1h TA
α-Scr (36D10) Cell Signaling Technology	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:1,000 Leche al 5%	1:10,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-MEK GTX50313 GeneTex	PBS 1x Tween 0.05%	Leche al 5 % 1 h	1:6,000 Leche al 5%	1:5,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-MAPK (9102) Cell Signaling Technology	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:4.000 Leche 5%	1:10,000 α-Conejo HRP 1h TA
α-p-MAPK (D13.14.4E) (4370S) Cell Signaling Technologies	TBS 1x Tween 0.1%	Leche al 5 % 1 h	1:4.000 Leche 5%	1:10,000 α-Conejo HRP 1h TA



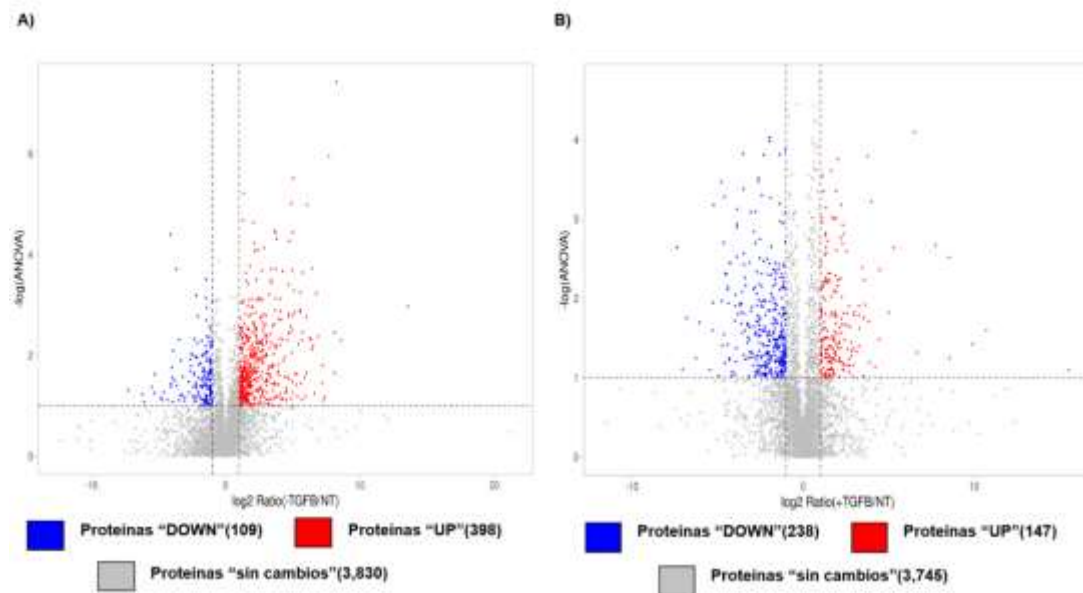
Anexo 2. SNU-423 no es tumorigénica en el modelo de ratón NSG. En el anexo 2 se detallan los resultados de los ensayos de tumorigénesis realizados de manera subcutánea y ortotópica y se incluyó una inyección por vena de la cola en el modelo de ratón NSG para evaluar el desarrollo tumoral. **A)** Diagrama de modelo de trasplante subcutáneo en el ratón NSG. Se inocularon en el dorso del ratón con SNU-423 (7×10^6 células) en $100\mu\text{L}$ en RPMI libre de suero junto con Matrigel© (1:1). Los ratones fueron monitoreados por 2 a 6 semanas después de la implantación. No se observó desarrollo tumoral en el dorso del ratón. **B)** Diagrama de modelo de trasplante ortotópico en el hígado del ratón NSG. Las células de SNU-423 (1×10^6 células) fueron suspendidas en RPMI libre de suero, y colocadas en hielo hasta el momento de la inyección. A continuación, se anestesió al ratón, se realizó una incisión en la línea alba en la pared abdominal para exponer el hígado. Después, las células SNU-423 se mezclaron en volumen 1:1 con Matrigel© antes de la inyección. La inyección se realizó de manera ortotópica en tres sitios diferentes del hígado: Dos en la izquierda- lateral y uno en el lóbulo izquierdo en medio del hígado. Los ratones fueron monitoreados por 2 a 6 semanas después de la implantación. No se observó desarrollo tumoral en el hígado o pulmón. **C)** Diagrama de inyección por vena de la cola en el ratón NSG. Se inocularon con células SNU-423 (1×10^6 células) a 1/3 del nacimiento de la cola

del ratón. Los ratones fueron monitoreados por 2 a 6 semanas después de la implantación. No se observó desarrollo tumoral en el hígado o pulmón.

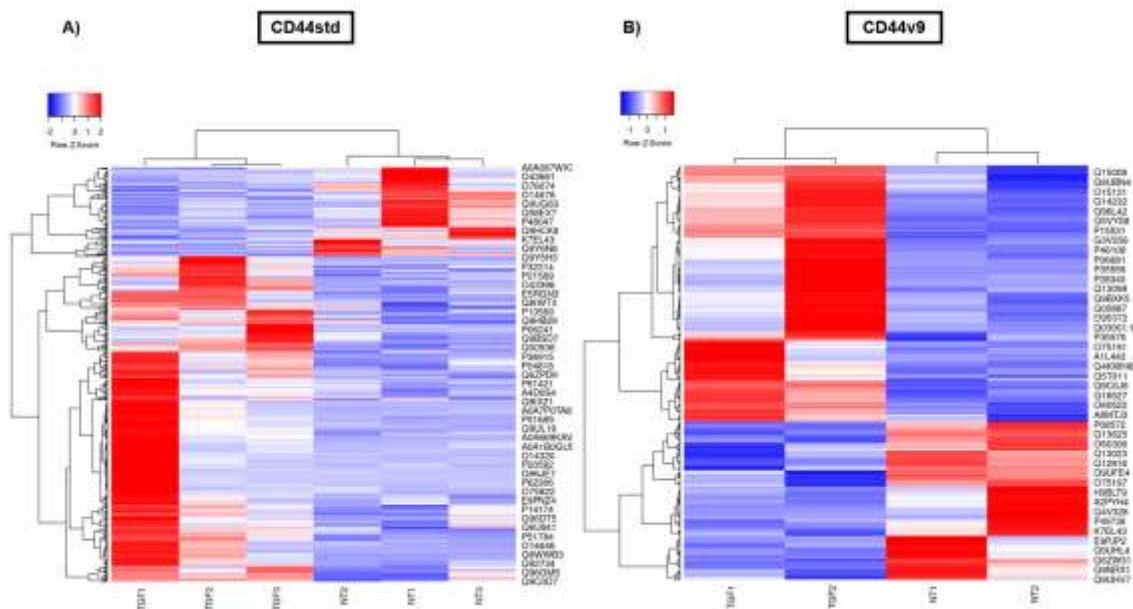


Anexo 3. Análisis de fiabilidad y confianza de péptido. **A)** Histograma que representa un total de 967,807 péptidos detectados en todas las inyecciones; el 86.33% (833,805) de ellos caen dentro de un margen de error de ± 10 ppm (resaltado en naranja fuerte). Esto demuestra que el espectrómetro de masas mantuvo una calibración de masa precisa como se esperaba. La mayoría de los péptidos se espera que tengan errores dentro de ± 10 ppm, y ningún péptido tuvo un error mayor de ± 36 ppm. **B)** Gráfico de pastel que ilustra los tipos de péptidos detectados en todos los análisis. La mayoría (66%) pertenece a las categorías PepFrag1 y VarMod, que se consideran las más confiables debido a su adherencia a un modelo teórico que implica una digestión enzimática completa, un alto número de productos de iones coincidentes, una fuerte correlación en la intensidad de los productos de iones en comparación con los iones precursor, y 14 atributos fisicoquímicos que contribuyen a su puntuación de péptidos. Los péptidos VarMod también incluyen aquellos con modificaciones variables, como las PTM. Aproximadamente el 22.2% se clasifican como PepFrag2, que representan péptidos con menor fiabilidad, ya que se identificaron con menos restricciones en

la intensidad de los productos de iones durante una segunda ronda de búsqueda en la base de datos. Además, el 11.6% son péptidos con MissedCleaveage, lo que indica la eficiencia de la digestión realizada por el kit PreOmics®. Menos del 0.2% representan péptidos fragmentados en la fuente de iones y péptidos que muestran pérdida neutral de H₂O, NH₃ o H₃PO₄. **C)** Como se anticipaba, la mayoría de los péptidos de alta calidad se concentran dentro de un margen de error máximo de ±10 ppm en todo el rango m/z analizado (representado en negro). Además, la proporción más alta de péptidos se encuentra dentro de un rango m/z de 400-1200, lo cual es normal dada la complejidad de las muestras digeridas enzimáticamente. **D)** Gráfico que muestra la abundancia en forma logarítmica de los iones de péptidos. Estos iones de péptidos abarcan más de siete órdenes de magnitud (expresados en logaritmo base 10), lo que indica la excelente sensibilidad del espectrómetro de masas. Los datos se agrupan y se representan como proporciones, con los iones de péptidos identificados resaltados en amarillo.



Anexo 4. Volcano plot de proteínas filtradas de los datos proteómicos de CD44std y CD44v9 después del tratamiento con TGF- β . **A)** Se presentan las proteínas filtradas de las células CD44std. En total., se muestran 4,337 proteínas en el mapa de calor. Las proteínas que no presentan cambios significativos se muestran en círculos grises (3,830), las proteínas que están subreguladas se representan con círculos azules (109), y las proteínas sobrerreguladas se representan con círculos rojos (398). En el eje horizontal (abscisa) se muestra el valor de p para cada una de las proteínas detectadas en el triplicado técnico, representado como Log_{10} . En el eje vertical se presenta (ordenada) el $-\text{Log ANOVA}$ para cada proteína detectada, con valores representados como logaritmo de base 2. **B)** Se muestran las proteínas filtradas de las células CD44v9. En total se representan (4,130) en el mapa de calor. Las proteínas filtradas que no presentan cambios significativos se muestran en círculos grises (3,745), las proteínas subreguladas se presentan con círculos azules (238), y las proteínas sobrerreguladas se representan con círculos rojos (147). Al igual que en el inciso A, la abscisa del eje corresponde al valor de p a cada una de las proteínas detectadas en el triplicado técnico (valores representados como $-\text{Log}_{10}$) y la ordenada del eje ($-\text{Log ANOVA}$) por cada proteína detectada (los valores son representados como logaritmo base 2).



Anexo 5. El heat map representa la abundancia de proteínas subreguladas y sobrerreguladas en CD44std y CD44v9 después del tratamiento con a TGF- β .

A) Se presenta el triplicado de las proteínas de las células CD44std y en **B)** Se presenta el duplicado de las proteínas de las células CD44v9 de ambas condiciones fueron usadas para generar el mapa. La abundancia relativa es representada usando “Z-score”. Se muestran diferencias significativas en la expresión de las proteínas de las células CD44std y CD44v9.

Anexo 6. Lista de proteínas UP y DOWN de células CD44std NT vs TGF- β .

Accesión	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3	NT2	NT1	NT3
Q9Y2T3	111.3671 92	133.5342 8	501.1723 37	480.6446 34	909.9828 51	317.9201 65
Q9C0H5	2732.478 2	5531.153 35	5670.623 72	5710.516 42	19942.95 88	8642.910 34
H0YKE0	732.4244 36	4437.547 77	3758.288 59	31929.23 43	56084.42 88	27083.49 86
Q86YS6	55.85235 28	517.4726 44	61.07476 12	297.5601 78	749.9531 95	761.4951 57
Q9P253	3510.136 42	4803.281 46	4304.391 63	6464.461 08	11797.90 35	7503.778 52
Q6ZWT7	639.6738 03	307.4660 23	133.3342 42	425.0064 9	10947.39 78	6108.796 96
Q53SF7	0	22.27924 82	27.16962 46	75.71009 76	23.00651 32	146.2854 86
P12821	1473.551 79	5728.207 25	7070.309 98	9018.872 63	9412.704 86	12045.31 58
Q6ZNL6	29.81107 24	7.271375 39	5.794641 49	213.4796 79	204.1122 09	15.35223 39
Q9Y5H3	896.9556 48	2366.772 71	454.9897 63	40.33406 34	0	38.55460 48
O43861	191.0091 69	365.9149 17	136.3154 35	24.53166 23	70.79037 3	158.6162 19
Q13325	242.0973 68	447.8485 89	48.07496 71	16.73187 64	71.21871 95	56.97454 62
Q7L1S5	159.9249 11	565.7303 3	362.0361 42	32.84180 75	1.545109 04	0
Q1ED39	136.7598 71	137.2872 38	59.40776 51	23.94495 87	5.072485 82	26.42049 73
O43766	129.7130 11	112.3203 28	73.50674 54	113.5302 73	9.230072 73	9.944614 16
Q96PK6-5	97.26518 32	62.07947 74	119.8440 8	71.08770 57	17.15256 85	31.30143 89
Q9BVI4	199.6295 7	173.0040 19	491.7843 92	147.5461 34	180.3903 7	87.51587 94
Q8TBZ2	12.35368 58	15.04120 74	50.66511	13.31250 09	0	0.167686 83
P33981	509.1474 13	617.0339 45	621.6754 78	263.3650 38	168.6488 78	318.4408 67
P14649	246.4409 41	96.29507 23	148.1326 38	41.19578 02	0	48.10029 77
P04818	406.2210	217.8699	262.7558	5.971878	0	120.6095

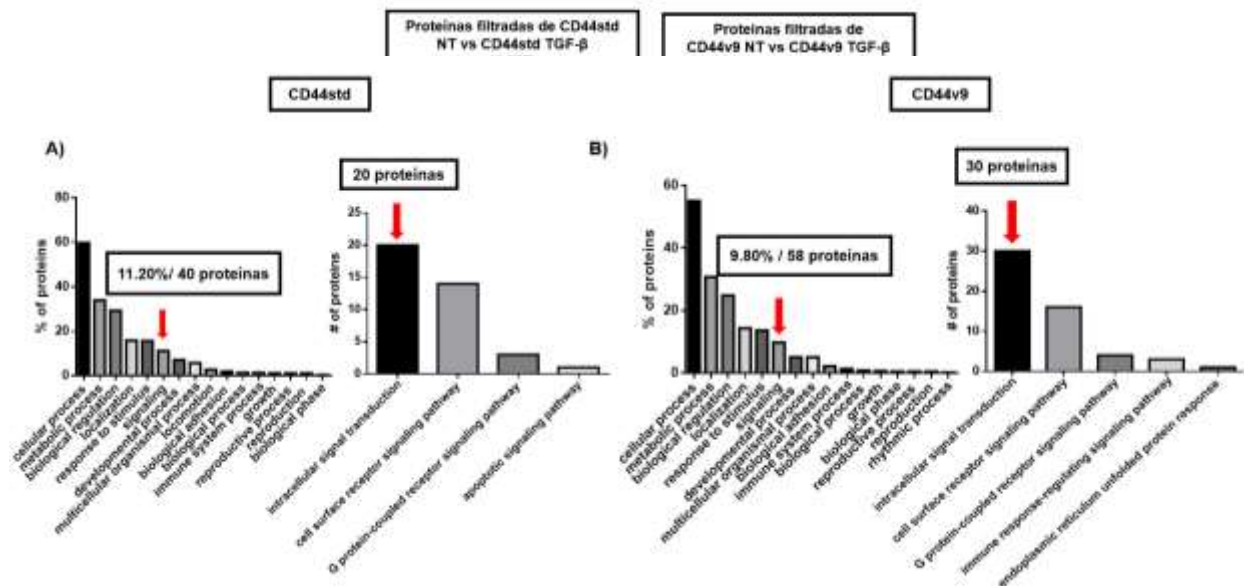
	39	65	79	07		01
Q5SZE1	432.2077 37	168.8742 37	260.9460 67	99.68761	12.44849 58	12.45716 35
A0A087X0 R0	74.58020 72	17.75486 95	23.50777 39	10.40133 89	0	0
Q16643	946.5943 27	254.2650 75	368.6642 12	204.5217 84	29.87195 75	234.3442 8
E9PJC7	1595.809 53	422.0024 52	84.85259 92	55.32492 13	4.975358 27	8.019466 17
Q2M1P5	825.4412 99	220.4855 12	106.9178 07	43.12021 75	143.2937 86	69.86999 29
Q96EA4	1290.573 37	293.1885 1	162.7200 92	140.5314 98	12.00434 09	43.30111 59
P09661	332.5575 24	142.1724 34	155.0507 23	68.80971 17	105.6066 86	127.1659 61
A0A8J9AU I2	616.1342 43	45.52816 87	81.30680 84	8.489912 25	0	51.29220 1
O43464-2	704.0993 04	77.57106 84	80.86599 17	45.31292 21	0	15.14570 36
Q6P2D0	961.5343 37	166.5914 47	21.72795 61	4.386639 89	9.380902 35	21.99604 48
Q96JE7	2203.697 29	45.24051 3	9.248830 23	52.14152 88	13.67471 85	0
D6RB59	3334.824 02	226.6247 23	103.9216 72	57.38178 85	10.81899 43	168.2313
P12955	657.3092 05	130.8492 93	110.1523 07	121.6552 89	34.03949 11	90.04852 09
Q86XP3	3405.012 98	884.6662 1	766.6183 68	172.7230 5	1099.809 64	574.7091 04
A0A140T9 T7	520.0654 69	270.5745 27	162.3275 73	72.49959 54	111.5649 99	222.9933 1
Q9BUP0	208.2763 08	83.21621 98	96.94183 02	60.27143 87	7.000323 05	91.36492 07
Q9ULI0	812.0888 86	433.9353 47	179.3679 49	345.3975 54	76.03456 09	69.69526 32
A0A5F9ZG X0	1612.179 27	874.6195 55	385.7215 66	496.1980 47	229.6431 19	271.4777 04
Q9UGN5	334.6678 81	168.1009 9	9.649235 13	10.51931 88	0.586563 85	8.395281 04
Q68CZ2	350.0282 04	177.3523 46	95.79368 85	40.13409 87	38.14945 13	109.0174 38
P50897	341.7988 65	241.7004 06	407.3163 84	86.22474 45	146.6492 09	207.1053 44
Q9C0D7	1252.737 32	874.1357 67	895.5662 43	229.0832 19	514.9168 34	725.0117 03

Anexo 7. Lista de proteínas UP y DOWN de células CD44v9 NT vs TGF- β .

Accesión	TGFβ1	TGFβ2	NT1	NT2
Q15008	1123.48138	1405.70824	399.8921	108.510103
Q9UBN4	164.177491	238.606366	76.6095346	18.2577107
O15131	60.3626085	116.036442	37.5000011	15.457315
Q96L42	108.473046	148.111883	47.1216617	41.408725
Q5VYS8	146.98358	205.305774	78.7859379	79.0089682
P15531	1207.35021	1228.70727	607.382494	482.830595
G3V256	437.855483	863.236735	183.374713	244.92598
P46108	69.0243316	186.625178	4.69199652	0
P06681	20.6500943	111.167298	5.35817633	6.70593973
P35556	76.6583335	230.518417	37.5888001	39.6577628
P28340	20.90915	125.101611	1.75462596	8.01244205
Q13098	85.0907652	241.299089	31.55284	67.645631
Q9B XK5	51.9138433	134.925034	32.1193824	7.40546994
Q00887	125.741413	462.075495	52.7123963	9.44537222
O95372	222.124331	926.338396	161.816421	25.4774081
Q03001	95.5546026	1327.6188	85.2148748	0
P35579	62770.2267	83358.7159	26177.9489	46075.4868
O75191	603.405383	241.001742	84.9369219	71.7279747
A1L443	539.358411	115.144026	45.6025257	7.79581541
Q4KWH8	110.744093	74.1821456	40.9323323	37.7494707
Q5T011	273.270743	154.522654	54.8303148	12.666204
Q9C0J8	351.401268	349.85166	36.6890968	78.1143615
Q16527	618.600496	460.571866	68.3929373	142.825311
O60522	1761.01906	1506.57222	773.821021	503.078043
A8MTJ3	305.325092	233.821674	174.89071	85.1166709
P08572	602.007215	532.485554	1037.23844	1346.00719
Q13625	3.40003571	27.726899	93.7780839	103.626426
O60306	170.362713	311.0931	674.497682	903.669634
Q13023	23.2451922	48.0346376	107.351604	91.9640276
Q12816	332.194424	591.673882	1973.19527	1526.84615
Q9UFE4	236.456409	30.0454987	446.543908	413.97929
O75197	1048.53179	618.201561	1627.52305	1902.15552
H3BLT9	337.92308	239.037763	506.210488	1306.61958
A2PYH4	541.860014	283.0499	793.825009	1722.80738
Q4V328	0	11.4442348	284.170012	2056.36702

P49736	1188.05873	1922.66878	2404.04753	5808.79734
K7EL43	2419.94483	1803.71122	3907.47322	5905.15481
E9PJP2	92.2093169	47.6007767	635.083913	142.881624
Q9UHL4	91.1581586	59.4046902	464.08379	218.890281
Q6ZW31	136.308307	3.31748666	631.291153	436.729679
Q9NRX1	302.086999	173.271586	635.639116	389.618501
Q9UHV7	38.4169403	0	128.959026	26.1115498

Anexo 8. Determinación de proteínas exclusivas y diferenciales de las células CD44std y CD44v9. El diagrama de Venn muestra las proteínas exclusivas en células CD44std (229) y células CD44v9 (22) a través de proteínas filtradas de células CD44std (4,337) y de células CD44v9 (4,130) NT después del



tratamiento con TGF-β. Estas proteínas exclusivas son sumadas a las proteínas diferenciales (subreguladas y sobreguladas) en células CD44std (507) y en células CD44v9 (385) para ser analizadas en la plataforma GO con 736 proteínas de las células CD44std y 407 proteínas de las células CD44v9.

Anexo 9. Análisis del conjunto de proteínas analizadas en las células CD44std y en las células CD44v9 por la plataforma de Gene Ontology (GO) para la evaluación de la señalización por TGF-β. A) Se muestra el porcentaje de proteínas en vías biológicas (11.20 %/ 40 proteínas) y 20 proteínas asociadas a

la señalización en células CD44std después del tratamiento con TGF- β . **B)** Se muestra el porcentaje de proteínas (9.80%/ 58 proteínas) en vías biológicas y el 30 de proteínas asociadas a la señalización en células CD44std después del tratamiento con TGF- β .

14.REFERENCIAS

1. Lee, G., R.R. Hall, 3rd, and A.U. Ahmed, *Cancer Stem Cells: Cellular Plasticity, Niche, and its Clinical Relevance*. J Stem Cell Res Ther, 2016. **6**(10).
2. Teng, Y.D., et al., *Cancer Stem Cells or Tumor Survival Cells?* Stem Cells Dev, 2018. **27**(21): p. 1466-1478.
3. Antoniou, A., et al., *Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property?* Cell Cycle, 2013. **12**(24): p. 3743-8.
4. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 267-84.
5. (RAE), R.A.E. *Definición de "troncal" y "madre"*. 2020.
6. Maehle, A.H., *Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries*. Notes Rec R Soc Lond, 2011. **65**(4): p. 359-78.
7. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
8. Atashzar, M.R., et al., *Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications*. J Cell Physiol, 2020. **235**(2): p. 790-803.
9. Cabrera, M.C., R.E. Hollingsworth, and E.M. Hurt, *Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy*. World J Stem Cells, 2015. **7**(1): p. 27-36.
10. Moharil, R.B., et al., *Cancer stem cells: An insight*. J Oral Maxillofac Pathol, 2017. **21**(3): p. 463.

11. Chandrakesan, P., et al., *Regulatory Roles of Dclk1 in Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells*. J Carcinog Mutagen, 2016. **7**(2).
12. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer stem cells*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1253-61.
13. Bu, P., et al., *Asymmetric division: a marker for cancer stem cells in early stage tumors?* Oncotarget, 2013. **4**(7): p. 950-1.
14. Plaks, V., N. Kong, and Z. Werb, *The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?* Cell Stem Cell, 2015. **16**(3): p. 225-38.
15. Rich, J.N., *Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(1 Suppl 1): p. S2-7.
16. Wang, T., et al., *Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44191-206.
17. Vanneman, M. and G. Dranoff, *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 237-51.
18. Safa, A.R., *Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells*. Crit Rev Oncog, 2016. **21**(3-4): p. 203-219.
19. Chen, H., et al., *CD133/prominin-1-mediated autophagy and glucose uptake beneficial for hepatoma cell survival*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56878.
20. Ogawa, K., et al., *Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives*. Anticancer Res, 2013. **33**(3): p. 747-54.
21. Shiozawa, Y., et al., *Cancer stem cells and their role in metastasis*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(2): p. 285-93.
22. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
23. Chaffer, C.L., et al., *Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7950-5.
24. O'Brien-Ball, C. and A. Biddle, *Reprogramming to developmental plasticity in cancer stem cells*. Dev Biol, 2017. **430**(2): p. 266-274.
25. Kusoglu, A. and C. Biray Avci, *Cancer stem cells: A brief review of the current status*. Gene, 2019. **681**: p. 80-85.
26. Gopalan, V., F. Islam, and A.K. Lam, *Surface Markers for the Identification of Cancer Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2018. **1692**: p. 17-29.
27. Battle, E. and H. Clevers, *Cancer stem cells revisited*. Nat Med, 2017. **23**(10): p. 1124-1134.
28. Kim, W.T. and C.J. Ryu, *Cancer stem cell surface markers on normal stem cells*. BMB Rep, 2017. **50**(6): p. 285-298.
29. Ji, J. and X.W. Wang, *Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma*. Semin Oncol, 2012. **39**(4): p. 461-72.
30. Chen, Y., et al., *CD133(+)/EpCAM(+) phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(7): p. 992-1004.
31. Vassalli, G., *Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells*. Stem Cells Int, 2019. **2019**: p. 3904645.

32. Boesch, M., G. Spizzo, and A. Seeber, *Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. *Stem Cells Transl Med*, 2018. **7**(6): p. 495-501.
33. Glumac, P.M. and A.M. LeBeau, *The role of CD133 in cancer: a concise review*. *Clin Transl Med*, 2018. **7**(1): p. 18.
34. Sauzay, C., et al., *CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule*. *Front Cell Dev Biol*, 2019. **7**: p. 66.
35. Luo, J., et al., *The Notch pathway promotes the cancer stem cell characteristics of CD90+ cells in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(8): p. 9525-37.
36. Basakran, N.S., *CD44 as a potential diagnostic tumor marker*. *Saudi Med J*, 2015. **36**(3): p. 273-9.
37. Li, W., et al., *Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13856.
38. Lee, T.K., et al., *CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(1): p. 50-63.
39. Richard, V., et al., *Side population cells as prototype of chemoresistant, tumor-initiating cells*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 517237.
40. Donnenberg, V.S., et al., *Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. **78**(5): p. 287-301.
41. Zhao, W., Y. Li, and X. Zhang, *Stemness-Related Markers in Cancer*. *Cancer Transl Med*, 2017. **3**(3): p. 87-95.
42. Flores-Tellez, T.N., S. Villa-Trevino, and C. Pina-Vazquez, *Road to stemness in hepatocellular carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(37): p. 6750-6776.
43. Toledo-Guzman, M.E., et al., *ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019. **14**(5): p. 375-388.
44. Imrich, S., M. Hachmeister, and O. Gires, *EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells*. *Cell Adh Migr*, 2012. **6**(1): p. 30-8.
45. Wang, L., et al., *The Role of CD44 and Cancer Stem Cells*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1692**: p. 31-42.
46. Wu, C. and B.A. Alman, *Side population cells in human cancers*. *Cancer Lett*, 2008. **268**(1): p. 1-9.
47. Kreso, A. and J.E. Dick, *Evolution of the cancer stem cell model*. *Cell Stem Cell*, 2014. **14**(3): p. 275-91.
48. Tirino, V., et al., *Methods for cancer stem cell detection and isolation*. *Methods Mol Biol*, 2012. **879**: p. 513-29.
49. Moghbeli, M., et al., *Cancer stem cell detection and isolation*. *Med Oncol*, 2014. **31**(9): p. 69.
50. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.

51. Shaheen, S., et al., *Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer*. Stem Cell Rev, 2016. **12**(4): p. 492-9.
52. Lee, C.H., et al., *Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs*. Oncotarget, 2016. **7**(2): p. 1215-26.
53. He, L., et al., *Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23306-22.
54. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
55. Thapa, R. and G.D. Wilson, *The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 2087204.
56. Prochazka, L., R. Tesarik, and J. Turanek, *Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer*. Cell Signal, 2014. **26**(10): p. 2234-9.
57. Naor, D., et al., *Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 260-7.
58. Brown, R.L., et al., *CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 1064-74.
59. Warzecha, C.C., et al., *ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 591-601.
60. Mima, K., et al., *CD44s regulates the TGF-beta-mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3414-23.
61. Reinke, L.M., Y. Xu, and C. Cheng, *Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial-mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36435-42.
62. Horiguchi, K., et al., *TGF-beta drives epithelial-mesenchymal transition through deltaEF1-mediated downregulation of ESRP*. Oncogene, 2012. **31**(26): p. 3190-201.
63. Tripathi, V., et al., *Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF-beta*. Mol Cell, 2016. **64**(5): p. 1010.
64. Azevedo, R., et al., *CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications*. Clin Proteomics, 2018. **15**: p. 22.
65. Platt, V.M. and F.C. Szoka, Jr., *Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 474-86.
66. Jordan, A.R., et al., *The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 182.
67. Bourguignon, L.Y., M. Shiina, and J.J. Li, *Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression*. Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 255-75.

68. Mori, H., et al., *CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain*. EMBO J, 2002. **21**(15): p. 3949-59.
69. Williams, K., et al., *CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(3): p. 324-38.
70. Lesley, J., et al., *The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding*. Eur J Immunol, 2000. **30**(1): p. 245-53.
71. Ilangumaran, S., B. Borisch, and D.C. Hoessli, *Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains*. Leuk Lymphoma, 1999. **35**(5-6): p. 455-69.
72. Okamoto, I., et al., *Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway*. J Cell Biol, 2001. **155**(5): p. 755-62.
73. Cho, Y., et al., *Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8709-21.
74. Lee, J.L., M.J. Wang, and J.Y. Chen, *Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44*. J Cell Biol, 2009. **185**(6): p. 949-57.
75. Su, Y.J., et al., *Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44*. EMBO J, 2011. **30**(15): p. 3186-99.
76. Thorne, R.F., J.W. Legg, and C.M. Isacke, *The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 3): p. 373-80.
77. Yan, Y., X. Zuo, and D. Wei, *Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(9): p. 1033-43.
78. Su, J., et al., *Identification of cancer stem-like CD44+ cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line*. Arch Med Res, 2011. **42**(1): p. 15-21.
79. Takaishi, S., et al., *Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44*. Stem Cells, 2009. **27**(5): p. 1006-20.
80. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
81. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
82. Hou, Y., et al., *The critical role of CD133(+)/CD44(+)/high tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 259-72.
83. Ishimoto, T., et al., *CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth*. Cancer Cell, 2011. **19**(3): p. 387-400.
84. Asai, R., et al., *CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line*. Cancer Med, 2019. **8**(2): p. 773-782.

85. Tsubouchi, K., et al., *The CD44 standard isoform contributes to radioresistance of pancreatic cancer cells*. J Radiat Res, 2017. **58**(6): p. 816-826.
86. Prince, M.E., et al., *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 973-8.
87. Meng, E., et al., *CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival*. Clin Exp Metastasis, 2012. **29**(8): p. 939-48.
88. Chen, W., et al., *Identification of CD44+ cancer stem cells in human gastric cancer*. Hepatogastroenterology, 2013. **60**(124): p. 949-54.
89. Ohata, H., et al., *Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells*. Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 5101-10.
90. Mielgo, A., et al., *A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms*. Cell Death Differ, 2006. **13**(3): p. 465-77.
91. Chen, C., et al., *The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 64.
92. Schwarz, L.J., et al., *An ERBB1-3 Neutralizing Antibody Mixture With High Activity Against Drug-Resistant HER2+ Breast Cancers With ERBB Ligand Overexpression*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(11).
93. Morath, I., et al., *Differential recruitment of CD44 isoforms by ErbB ligands reveals an involvement of CD44 in breast cancer*. Oncogene, 2018. **37**(11): p. 1472-1484.
94. Todaro, M., et al., *CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(3): p. 342-56.
95. Tremmel, M., et al., *A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis*. Blood, 2009. **114**(25): p. 5236-44.
96. Tripathi, V., et al., *Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF-beta*. Mol Cell, 2016. **64**(3): p. 549-564.
97. Miwa, T., et al., *Isoform switch of CD44 induces different chemotactic and tumorigenic ability in gallbladder cancer*. Int J Oncol, 2017. **51**(3): p. 771-780.
98. Hiraga, T. and H. Nakamura, *Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model*. Oncol Lett, 2016. **12**(4): p. 2962-2969.
99. Zeilstra, J., et al., *Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling*. Oncogene, 2014. **33**(5): p. 665-70.
100. Olsson, E., et al., *CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 418.

101. Lau, W.M., et al., *CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2014. **74**(9): p. 2630-41.
102. Bourguignon, L.Y.W., C. Earle, and M. Shiina, *Activation of Matrix Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling, Epigenetic Regulation and Chemoresistance in Head and Neck Cancer Stem Cells*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(9).
103. Primeaux, M., S. Gowrikumar, and P. Dhawan, *Role of CD44 isoforms in epithelial-mesenchymal plasticity and metastasis*. *Clin Exp Metastasis*, 2022. **39**(3): p. 391-406.
104. Hayakawa, A., M. Saitoh, and K. Miyazawa, *Dual Roles for Epithelial Splicing Regulatory Proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) in Cancer Progression*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **925**: p. 33-40.
105. Zhang, H.Y. and K.F. Dou, *PCBP1 is an important mediator of TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition in gall bladder cancer cell line GBC-SD*. *Mol Biol Rep*, 2014. **41**(8): p. 5519-24.
106. Chen, Q., et al., *TGF-beta1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness of prostate cancer cells by inducing PCBP1 degradation and alternative splicing of CD44*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(3): p. 949-962.
107. Zhou, J., et al., *CD44 Expression Predicts Prognosis of Ovarian Cancer Patients Through Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating Snail, ZEB1, and Caveolin-1*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 802.
108. Wang, J., et al., *CD44v6 promotes beta-catenin and TGF-beta expression, inducing aggression in ovarian cancer cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(5): p. 3505-10.
109. Bhattacharya, R., et al., *Mesenchymal splice isoform of CD44 (CD44s) promotes EMT/invasion and imparts stem-like properties to ovarian cancer cells*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(4): p. 3373-3383.
110. Taniguchi, D., et al., *CD44v9 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor outcomes in esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Med*, 2018. **7**(12): p. 6258-6268.
111. Qiu, S., et al., *CD44v3,8-10 is essential for Slug-dependent vimentin gene expression to acquire TGF-beta1-induced tumor cell motility*. *Cancer Sci*, 2022. **113**(8): p. 2654-2667.
112. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
113. Recio-Boiles, A., A. Waheed, and H.M. Babiker, *Cancer, Liver*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
114. Sia, D., et al., *Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(4): p. 745-761.
115. Pascual, S., I. Herrera, and J. Irurzun, *New advances in hepatocellular carcinoma*. *World J Hepatol*, 2016. **8**(9): p. 421-38.
116. Endo, K. and T. Terada, *Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival*. *J Hepatol*, 2000. **32**(1): p. 78-84.

117. Mima, K., et al., *The expression levels of CD44v6 are correlated with the invasiveness of hepatocellular carcinoma in vitro, but do not appear to be clinically significant.* *Oncol Lett*, 2012. **3**(5): p. 1047-1051.
118. Nishiyama, M., et al., *Metastatic ability and the epithelial-mesenchymal transition in induced cancer stem-like hepatoma cells.* *Cancer Sci*, 2018. **109**(4): p. 1101-1109.
119. Park, N.R., et al., *Synergistic effects of CD44 and TGF-beta1 through AKT/GSK-3beta/beta-catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **477**(4): p. 568-574.
120. Mima, K., et al., *High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy.* *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2013. **20**(4): p. 429-34.
121. Okabe, H., et al., *CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma.* *Br J Cancer*, 2014. **110**(4): p. 958-66.
122. Biddle, A., et al., *CD44 staining of cancer stem-like cells is influenced by down-regulation of CD44 variant isoforms and up-regulation of the standard CD44 isoform in the population of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition.* *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e57314.
123. Akamine, T., et al., *The Significance of CD44 Variant 9 in Resected Lung Adenocarcinoma: Correlation with Pathological Early-Stage and EGFR Mutation.* *Ann Surg Oncol*, 2019. **26**(5): p. 1544-1551.
124. Kasashima, H., et al., *An Orthotopic Implantation Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma with Underlying Liver Steatosis.* *STAR Protoc*, 2020. **1**(3): p. 100185.
125. Rios-Castro, E., et al., *Quantitative Proteomic Analysis of MARC-145 Cells Infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Using a Label-Free Based DIA approach.* *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020. **31**(6): p. 1302-1312.
126. Zhang, H., et al., *CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state.* *Genes Dev*, 2019. **33**(3-4): p. 166-179.
127. Navaglia, F., et al., *CD44v10: an antimetastatic membrane glycoprotein for pancreatic cancer.* *Int J Biol Markers*, 2003. **18**(2): p. 130-8.
128. Aso, T., et al., *Induction of CD44 variant 9-expressing cancer stem cells might attenuate the efficacy of chemoradioselection and Worsens the prognosis of patients with advanced head and neck cancer.* *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0116596.
129. Tsugawa, H., et al., *Cancer Stem-Cell Marker CD44v9-Positive Cells Arise From Helicobacter pylori-Infected CAPZA1-Overexpressing Cells.* *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019. **8**(3): p. 319-334.
130. Sun, C., et al., *Corrigendum to "NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway" [Int. J. Biochem. Cell Biol. (2013) 1099-1108].* *Int J Biochem Cell Biol*, 2018. **105**: p. 144.

131. Sun, C., et al., *Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug*. *Med Oncol*, 2013. **30**(2): p. 503.
132. Badawi, M., et al., *CD44 positive and sorafenib insensitive hepatocellular carcinomas respond to the ATP-competitive mTOR inhibitor INK128*. *Oncotarget*, 2018. **9**(40): p. 26032-26045.
133. Govaere, O., et al., *The PDGFRalpha-laminin B1-keratin 19 cascade drives tumor progression at the invasive front of human hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2017. **36**(47): p. 6605-6616.
134. Mitra, A., et al., *Cell-surface Vimentin: A mislocalized protein for isolating csVimentin(+) CD133(-) novel stem-like hepatocellular carcinoma cells expressing EMT markers*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(2): p. 491-6.
135. Zhou, J.N., et al., *MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4*. *Hepatology*, 2015. **62**(3): p. 801-15.
136. McFarlane, S., et al., *CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices*. *Oncotarget*, 2015. **6**(34): p. 36762-73.
137. Shirure, V.S., et al., *CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015. **308**(1): p. C68-78.
138. Gao, Y., et al., *Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition*. *Oncotarget*, 2015. **6**(10): p. 7828-37.
139. Wang, D., et al., *Correction: Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2021. **12**(10): p. 1024-1025.
140. Zhao, X., et al., *Slug promotes hepatocellular cancer cell progression by increasing sox2 and nanog expression*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(1): p. 149-56.
141. Chen, Y.C., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **385**(3): p. 307-13.
142. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF-beta1 Induction of Lung Myofibroblasts*. *Matrix Biol*, 2015. **42**: p. 74-92.
143. Braicu, C., et al., *A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(10).
144. Fremin, C., et al., *ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes*. *Hepatology*, 2007. **45**(4): p. 1035-45.
145. Hsieh, Y.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4320-7.

146. Caliz, A.D., et al., *Mitogen-activated protein kinase kinase 7 in inflammatory, cancer, and neurological diseases*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 979673.
147. Ray, D., et al., *A tumor-associated splice-isoform of MAP2K7 drives dedifferentiation in MBNL1-low cancers via JNK activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(28): p. 16391-16400.
148. Organ, S.L. and M.S. Tsao, *An overview of the c-MET signaling pathway*. Ther Adv Med Oncol, 2011. **3**(1 Suppl): p. S7-S19.
149. Fu, J., et al., *HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence*. Oncogene, 2021. **40**(28): p. 4625-4651.
150. Nadiminty, N., et al., *Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3309-19.
151. Rinkenbaugh, A.L. and A.S. Baldwin, *The NF-kappaB Pathway and Cancer Stem Cells*. Cells, 2016. **5**(2).
152. Shin, S., et al., *ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events*. Mol Cell, 2010. **38**(1): p. 114-27.
153. Gusenbauer, S., et al., *Erk2 but not Erk1 regulates crosstalk between Met and EGFR in squamous cell carcinoma cell lines*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 54.
154. Xu, W., et al., *The Role of p38gamma in Cancer: From review to outlook*. Int J Biol Sci, 2021. **17**(14): p. 4036-4046.
155. Anton, D.B., et al., *A Special View of What Was Almost Forgotten: p38delta MAPK*. Cancers (Basel), 2021. **13**(9).
156. Yu, J.X., et al., *Phenotype-Based Screens with Conformation-Specific Inhibitors Reveal p38 Gamma and Delta as Targets for HCC Polypharmacology*. Mol Cancer Ther, 2019. **18**(9): p. 1506-1519.
157. Low, H.B. and Y. Zhang, *Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer*. Immune Netw, 2016. **16**(2): p. 85-98.
158. Guler, S. and A. Yalcin, *Expression of dual-specificity phosphatases in TGFss1-induced EMT in SKOV3 cells*. Turk J Med Sci, 2023. **53**(3): p. 640-646.
159. Zhang, H., et al., *DUSP16 ablation arrests the cell cycle and induces cellular senescence*. FEBS J, 2015. **282**(23): p. 4580-94.
160. Li, J.M., et al., *MicroRNA-27a-3p inhibits cell viability and migration through down-regulating DUSP16 in hepatocellular carcinoma*. J Cell Biochem, 2018. **119**(7): p. 5143-5152.
161. Wu, Q., et al., *Comprehensive Analysis of RAPGEF2 for Predicting Prognosis and Immunotherapy Response in Patients with Hepatocellular Carcinoma*. J Oncol, 2022. **2022**: p. 6560154.
162. Ksionda, O., A. Limnander, and J.P. Roose, *RasGRP Ras guanine nucleotide exchange factors in cancer*. Front Biol (Beijing), 2013. **8**(5): p. 508-532.
163. Nagy, Z., et al., *Function of RasGRP3 in the formation and progression of human breast cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 96.

164. Yang, D., et al., *RasGRP3 contributes to formation and maintenance of the prostate cancer phenotype*. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 7905-17.
165. Guo, Y.J., et al., *ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis*. *Exp Ther Med*, 2020. **19**(3): p. 1997-2007.
166. Moon, H. and S.W. Ro, *MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(12).
167. Sugiura, R., R. Satoh, and T. Takasaki, *ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer*. *Cells*, 2021. **10**(10).
168. Xie, L., et al., *Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 603-10.