

PROPUESTA PROFESOR VISITANTE

Carlos César Patiño Morales

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: “EFECTO DE ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS PROVENIENTES DE CÁNCER CERVICOUTERINO”

PROYECTO A DESARROLLAR EN LA UAM: “EFECTO DE LA CURCUMINA EN LA VÍA WNT/ β -CATENINA DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS PROVENIENTES DE CÁNCER CERVICOUTERINO”

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CaCu) continua siendo un problema importante de salud a nivel mundial ya que es el cuarto cáncer más común en mujeres y representa un estimado de 570,000 nuevos casos. (Bray *et al.* 2018). El virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-HR) es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer (Zur Hausen *et al.* 1975), aunque la mayoría de las infecciones se curan de manera espontánea, las infecciones persistentes son las que progresan a cáncer. Se sabe que el virus del papiloma humano (VPH) infecta las células basales del epitelio escamoso estratificado del cérvix, sin embargo López *et al.* 2012 proponen que el VPH también puede infectar las células troncales presentes en el epitelio cervical y ocasionar a largo plazo procesos de transformación dando lugar a la generación de células troncales cancerosas (CSC). En 2006 la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer definió a las células troncales cancerosas como: “Células dentro de un tumor que poseen la capacidad de autorrenovarse y originar todos los linajes de las células que componen el tumor” (Clarke *et al.* 2006). Esta población celular tiene una proliferación ilimitada y da lugar a células diferenciadas, recapitulando fenotípicamente los tumores originales y por lo tanto pueden ser responsables de la recaída de los pacientes y la resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Oshimori 2020).

Ortiz *et al.* 2016 establecieron y caracterizaron un modelo tridimensional *in vitro* para el estudio de células troncales cancerosas a partir de líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino, el modelo conocido como cervoesferas presenta expresión de marcadores de troncalidad como aumento en la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), y expresión de Sox, Nanog, Oct4, citoqueratina 17 (Ck-17) y CD49F, además se describió que estas células tienen alto potencial tumorigénico y la capacidad de autorrenovarse. La autorenovación es una propiedad inherente de las células troncales y es controlada por la activación de vías como la vía Wnt/ β -Catenina, la vía de Notch o la vía de Sonic Hedgehog, a la fecha no está completamente estudiado las vías de autorrenovación activas en el modelo de cervoesferas pero en un estudio reciente se comprobó que β -Catenina regula la

expresión de ALDH y Oct4 lo que indica la importancia de la activación de la vía Wnt/ β -Catenina en este modelo (Sarabia *et al.* 2020).

Es de relevancia clínica encontrar alternativas terapéuticas dirigidas contra este tipo celular y los antioxidantes son compuestos naturales con un ese potencial dado que una gran cantidad de estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre el consumo de frutas y verduras y la reducción del riesgo de varios cánceres, los compuestos dietéticos naturales han recibido una atención cada vez mayor por su eficacia en la prevención del cáncer (Das *et al.* 2019). Además hay estudios que señalan el potencial antitumoral de los antioxidantes Patiño *et al.* 2021 demostraron de la curcumina disminuye la viabilidad de líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino. También se conoce que algunos antioxidantes como el sulforafano el resveratrol y la piperina inhiben vías de autorrenovación en células troncales cancerosas (Li *et al.* 2011).

La importancia de este proyecto radica conocer cuál es el papel de la curcumina en el modelo de cervoesferas. Por lo que se propone describir el efecto del tratamiento con curcumina sobre la vía de Wnt/ β -Catenina en un modelo tridimensional novedoso de esferoides enriquecido con células troncales a partir de líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino (cervoesferas). En las células con tratamiento se medirán marcadores de troncalidad y se evaluará su potencial tumorigénico en un modelo *in ovo* usando la membrana corioalantoidea de *Gallus gallus domesticus*.

Objetivo General:

Analizar el efecto del tratamiento con curcumina en el modelo de cervoesferas de HeLa y SiHa enriquecidas con células troncales cancerosas.

Objetivos particulares:

1. Medir marcadores de troncalidad después del tratamiento de cervoesferas con curcumina.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con curcumina sobre la activación de la vía Wnt/ β -catenina.
3. Evaluar el potencial tumorigénico de cervoesferas tratadas con curcumumina en un modelo de *Gallus gallus*.

Metodología:

Cultivo de cervoesferas:

EL cultivo tridimensional de cervoesferas se generará a partir de las líneas de células humanas, HeLa (adenocarcinoma, VPH-18) y SiHa (carcinoma de células escamosas, VPH-16) las cuales se adquirieron de ATCC y fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología. Antes de iniciar el cultivo de esferas las células en monocapa deberán encontrarse en condiciones saludables con una confluencia del 70-80%. Estas células se recolectarán, contarán y lavarán con PBS para eliminar el resto de suero fetal bovino. Se sembrarán mil células por ml de medio DMEM F12 con factor de crecimiento epidermal y de fibroblastos en placas recubiertas con polihidroxietilmetacrilato. Las células se cultivarán en condiciones a 37 °C y una tensión de CO₂ del 5%.

Tratamiento con curcumina:

En el tercer día de inducción de esferoides las cervoesferas se dividirán en grupos: Sin tratamiento, vehículo, tratadas con 20 µM de curcumina y tratadas con 40 µM de curcumina, a estos esferoides se les documentará los cambios morfológicos, se analizará la viabilidad celular y se realizará extracción de proteínas.

Análisis del efecto de la curcumina en la vía de Wnt/ β -Catenina y marcadores de troncalidad:

Se realizará la medición de marcadores de troncalidad por citometría de flujo: CK17, y ALDH, además se medirán Nanog y Oct 4 por western blot.

Se medirán los niveles de β -Catenina y su traslocación al núcleo, así también se medirán los niveles de Frizzled7.

Análisis del efecto de la curcumina sobre el potencial tumorigénico de cervoesferas:

Después del tratamiento con curcumina se medirá la capacidad de las cervoesferas de generar tumores en la membrana corioalantoidea de *Gallus gallus domesticus*. Otro grupo de esferas será tratado con curcumina una vez que el tumor se haya formado para observar si disminuye el tamaño del tumor. Se medirán marcadores de proliferación sobre muestras obtenidas de los tumores.

Avances:

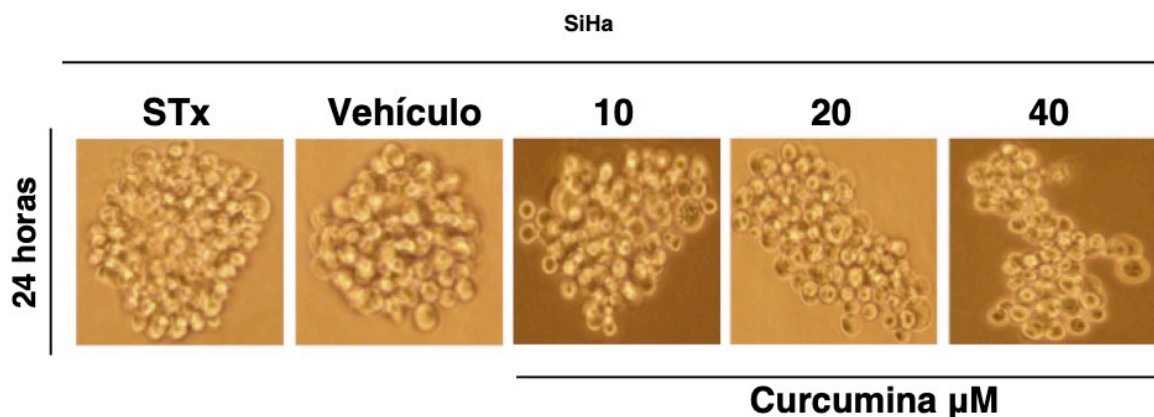


Figura 1. Efecto de la curcumina en cervoesferas. Las cervoesferas fueron tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, se observa un evidente cambio morfológico pero las células continúan siendo viables.

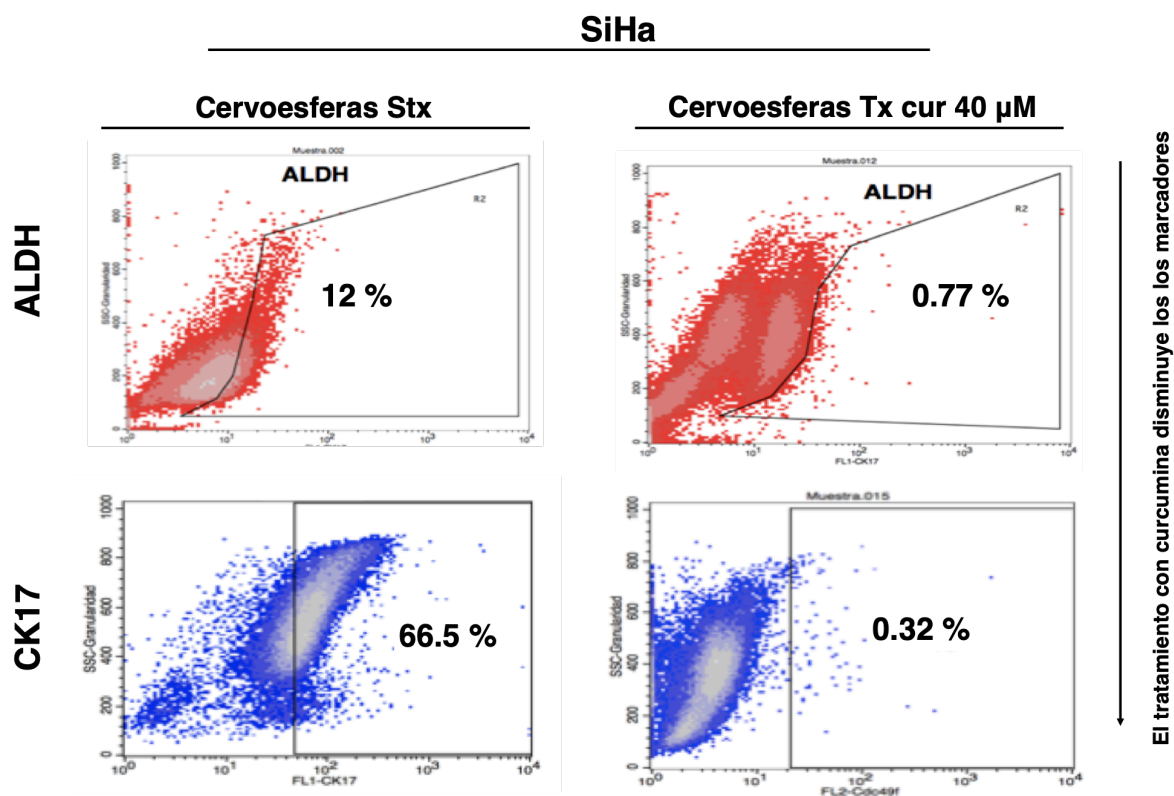


Figura 2. Efecto de la curcumina en marcadores de troncalidad de cervoesferas. El tratamiento con curcumina durante 24 horas disminuye los marcadores de troncalidad como la actividad de la enzima ALDH y Citoqueratina 17

Incorporación al grupo de trabajo en el Departamento de Ciencias Naturales:

Se propone un proyecto que puede generar interés en establecer colaboraciones interinstitucionales con algunos profesores investigadores de la UAM Cuajimalpa porque el tema implica:

Aporte del modelo de células troncales cancerosas como un modelo 3D para el estudio de cáncer: En este modelo no sólo se pueden evaluar mecanismos de autorrenovación, también pueden estudiarse los mecanismos moleculares de la radioresistencia y la quimioresistencia. El modelo de esferoides puede ser aplicado para el estudio de otros tipos de cáncer como el cáncer de mama, ovario, colon, etc.

Estudio de antioxidantes en cáncer: Propongo el estudio de moléculas antioxidantes en cáncer enfocado a las vías de autorrenovación pero también puede estudiarse la regulación de algunos otros procesos, por ejemplo la regulación epigenética que tienen los antioxidantes en células troncales cancerosas que está poco explorada.

Un modelo biológico (*Gallus gallus domesticus*) para la evaluación de tumorigenicidad. El modelo puede ser útil para evaluar tumorigenicidad, metástasis y vascularización en varios tipos de tumores, se puede usar para estudiar la biología del melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, etc. Otra aplicación es probar el efecto citotóxico, teratogénico o antitumoral de otros compuestos naturales o sintéticos. El modelo permite también poder modelar otras enfermedades aparte del cáncer y el estudio de biología del desarrollo y organogénesis.

Propuesta docente:

De acuerdo con mi formación puedo impartir la siguiente lista de UEAs, algunas de ellas las impartí en la UAM-Cuajimalpa y algunas otras las he impartido en otras universidades:

(Se han señalado en rojo las UEAs que ya he impartido en la UAM Cuajimalpa)

Primer nivel (Tronco general)	Biología celular
----------------------------------	------------------

Segundo nivel (Formación básica)	Bioquímica I Bioquímica II Introducción a la experimentación Introducción a la biología molecular Laboratorio de ciencia básica Laboratorio de bioquímica Biología celular II Métodos estadísticos Técnicas de caracterización molecular Técnicas de Biología molecular I Fisiología Molecular
Tercer nivel (Formación profesional)	Técnicas de biología molecular II
Optativas	Cultivo celular

Cronograma de actividades:

TRIMESTRE 21-P
Impartir dos materias obligatorias Cultivos de células troncales y tratamiento con curcumina Medición de marcadores de troncalidad Establecimiento en la UAM-C del modelo tumoral en pollo
TRIMESTRE 21-O
Impartir dos materias obligatorias Obtención de proteínas Evaluación de la vía de Wnt/B-catenina Proyecto terminal I
TRIMESTRE 22-I
Impartir una materia obligatoria Estudio de tumorigenicidad en el modelo de <i>Gallus gallus domesticus</i> Preparación de manuscrito Proyecto terminal II

El proyecto planteado puede realizarse en su totalidad con la infraestructura y material existentes en la UAM-C pero también cuenta con el apoyo de los siguientes colaboradores externos, los cuales además de proporcionar material y reactivos, ofrecen las instalaciones (laboratorios de investigación) y equipos

para poder llevar a cabo el proyecto en caso de requerirse un espacio adicional al laboratorio de biología celular de la UAM-C:

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá. Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Concepción Sánchez Gómez. Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Dr. José Pedraza Chaverri. Facultad de Química de la UNAM

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco Suárez

Dra. Verónica Antonio Vejar. Universidad Autónoma de Guerrero

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. Facultad de Odontología de la UNAM.

Entregables en un año:

- **Docencia:** Cinco UEAs impartidas
- **Investigación:**
 - ⇒ Publicación del artículo “Differential apoptotic effects of p53 isoforms determined by HPV type 16 E6 isoforms on cancer cells” actualmente en preparación
 - ⇒ Publicar el protocolo para el estudio de la tumorigenicidad de cervoesferas usando la membrana corioalantoidea en el modelo de *Gallus gallus*
 - ⇒ Publicación del artículo de revisión “Células troncales mesenquimales y su uso en medicina regenerativa” 60% de avance.
- **Formación de recursos humanos:** Finalización del Proyecto Terminal de un alumno de Biología Molecular
- **Financiamiento:** Aplicar a una convocatoria de CONACYT para conseguir patrocinio.

Referencias

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: CA Cancer J Clin. 2020 Jul;70(4):313.

Zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. Bibl Haematol. 1975 Oct;(43):569-71.

López J, Ruíz G, Organista-Nava J, Gariglio P, García-Carrancá A. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *Open Virol J*. 2012;6:232-40. Epub 2012 Dec 28.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9339-44.

Oshimori N. Cancer stem cells and their niche in the progression of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2020 Nov;111(11):3985-3992. doi: 10.1111/cas.14639.

Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñiz-Hernández S, Garrido E, Cantú De León D, García-Carrancá A. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*. 2016 May 31;7(22):31943-54.

Sarabia-Sánchez MÁ, Alvarado-Ortiz E, Toledo-Guzman ME, García-Carrancá A, Ortiz-Sánchez E. ALDH^{HIGH} Population Is Regulated by the AKT/ β -Catenin Pathway in a Cervical Cancer Model. *Front Oncol*. 2020 Jul 17;10:1039.

Li Y, Wicha MS, Schwartz SJ, Sun D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem*. 2011 Sep;22(9):799-806.

Das PK, Zahan T, Abdur Rakib M, Khanam JA, Pillai S, Islam F. Natural Compounds Targeting Cancer Stem Cells: A Promising Resource for Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(15):1796-1808.

Patiño-Morales CC, Soto-Reyes E, Arechaga-Ocampo E, Ortiz-Sánchez E, Antonio-Véjar V, Pedraza-Chaverri J, García-Carrancá A. Curcumin stabilizes p53 by interaction with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in tumor-derived cell lines. *Redox Biol*. 2020 Jan;28:101320. doi: 10.1016/j.redox.2019.101320.