



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CLONACIÓN DEL GEN *eIF4E* A PARTIR DE MODELOS *in vitro* DE
CÁNCER DE MAMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

SANDRA VIRIDIANA SALGADO HERNÁNDEZ

A S E S O R:

DR. FELIPE VACA PANIAGUA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Clonación del Gen eIF4E a partir de modelos *in vitro* de cáncer de mama.

Que presenta la pasante: **Sandra Viridiana Salgado Hernández**

Con número de cuenta: **410041819** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Agosto de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Olimpia Roxana Ponce Crippa	
VOCAL	Dr. Felipe Vaca Paniagua	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Dra. Ana Paola Rojas Meza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente proyecto de tesis fue desarrollado en el Laboratorio 13 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Felipe Vaca Paniagua.

A mis padres y hermanos.

Los amo.

“La familia nos da la oportunidad de un primer paso más allá del amor a uno mismo.”

-C.S. Lewis

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme, guiarme y permitirme llegar hasta este momento, por darme la fe y la fortaleza necesaria para lograr lo que me parecía imposible.

Agradezco a mis padres por todo lo que siempre han hecho por mí, por su apoyo, sus consejos, amor, comprensión, por su ayuda en los momentos más difíciles y sobre todo por creer en mí. A mi padre Eliazar Salgado por ser tan estricto y duro conmigo, por enseñarme a perseverar y a ser mejor cada día. A mi madre Sandra Hernández por ser mi mejor amiga, por apoyarme y animarme a continuar a pesar de todo, por ser para mí la mejor de las madres.

A mis queridos hermanos Sarai, Christopher y Karen por todo su cariño y apoyo. A Sarai por contagiarme siempre de su espíritu libre y de su alegría, a Cris por su ternura y por siempre hacerme reír con sus ocurrencias, a Karen por comprenderme cada día un poquito más.

A mi abuelita Josefina por ser una segunda madre para mí, por sus consejos y por ese gran afecto que siempre me ha brindado.

A mis tíos Fernando Reyes y Beatriz Hernández por ofrecerme un hogar, su ayuda y comprensión durante mi preparación profesional.

A mi amiga Sara Rodríguez por brindarme siempre su amistad sincera a pesar de la distancia, por todo su apoyo y cariño, porque más que una amiga es para mí como una hermana.

A mis amigos de la Facultad por otorgarme su valiosa amistad. A Omar por ser un gran compañero, amigo y una de las mejores personas que he conocido, por sus enseñanzas y por darme siempre todo su apoyo y cariño a pesar de las circunstancias. A Pedro Alfonso, César y Karen Amalinalli, por todas las cosas que compartimos, por brindarme su confianza, su ayuda y contagiarme de su alegría durante las clases y los trabajos en equipo.

“El fracaso es una gran oportunidad para empezar otra vez con más inteligencia.”

-Henry Ford.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por acogerme en sus aulas, por los profesores y sus enseñanzas, por brindarme las herramientas, oportunidades y el apoyo necesarios para mi desarrollo profesional.

Agradezco al Dr. Felipe Vaca Paniagua por su apoyo al ser mi director de tesis, brindándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio y colaborar con su equipo de trabajo para la realización de este proyecto, gracias por todo el tiempo dedicado a la revisión y mejora del mismo.

A la Dra. Clara Díaz por todos sus consejos, paciencia y ayuda, por su alegría y optimismo que hizo que mi estancia en el laboratorio fuera más divertida. Al Dr. Juan Manuel Arias por los recursos brindados para llevar a cabo el ensayo de transformación.

A mis compañeros y grandes amigos del laboratorio 13 de la UBIMED FES-Iztacala, Stef, Toño, Rosie, Héctor, Monse, Marco, Maciel, Itzel, Octavio, Zami, Marck, Ere y David, por todo el aprendizaje que me brindaron a nivel profesional y personal, por ofrecerme su amistad y por todos los momentos que compartimos.

Gracias a la Q.F.B. Olimpia Ponce, a la M. en C. Maritere Domínguez Rojas, al Q.F.B. Alejandro Gutiérrez y a la Dra. Ana Paola Rojas, por brindarme su tiempo, ayuda y consejos para la revisión y mejora del presente trabajo.

A todos los que conforman la sección de Genética, ya que gracias a ellos me adentré a ese mundo tan complejo y maravilloso, agradezco especialmente a la M. en C. Maritere por todo su apoyo y consejos a lo largo de la carrera, por ser una excelente profesora y sobre todo una excelente persona que cuenta con toda mi admiración.

A todas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal les agradezco su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas se encuentran conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

Muchas gracias.

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

-Marie Curie.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Cáncer	3
3.1.1 Definición.....	3
3.1.2 Epidemiología del cáncer	3
3.1.3 Factores de riesgo	5
3.1.4 Proceso de Carcinogénesis	7
3.2 Cáncer de mama	11
3.2.1 Definición.....	11
3.2.2 Epidemiología.....	11
3.2.3 Factores de riesgo	13
3.2.4 Anatomía de las glándulas mamarias femeninas	15
3.2.5 Clasificación	16
3.2.6 Tratamiento	19
3.3 Cáncer de mama triple negativo	21
3.3.1 Definición.....	21
3.3.2 Características.....	21
3.3.3 Clasificación molecular.....	22
3.3.4 Tratamiento	24
3.4 Cuerpos de Procesamiento	25
3.4.1 Generalidades	26
3.4.2 Diferencias con los gránulos de estrés	26
3.4.3 Composición.....	27
3.4.4 Formación.....	29
3.4.5 Participación en procesos celulares.....	31

3.4.6	Participación en procesos oncogénicos	31
3.5	<i>eIF4E</i>	33
3.5.1	Características.....	33
3.5.2	Localización y participación en procesos celulares	36
3.5.3	Participación en Cuerpos de Procesamiento.....	37
3.5.4	Participación en procesos oncogénicos	38
3.5.5	Importancia en el cáncer de mama.....	40
4.	JUSTIFICACIÓN	42
5.	OBJETIVOS	43
5.1	Objetivo General	43
5.2	Objetivos Particulares	43
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1	Diagrama General de Trabajo	44
6.2	RT-PCR	45
6.2.1	Diseño de oligonucleótidos	45
6.2.2	Extracción de RNA	45
6.2.3	Síntesis de cDNA.....	45
6.2.4	Amplificación de la secuencia codificante de <i>eIF4E</i>	46
6.2.5	Purificación de los productos de amplificación	47
6.2.6	Electroforesis en gel de agarosa.....	47
6.3	Clonación en vector de expresión.....	48
6.4	Transformación de células químicamente competentes.....	48
6.5	Tamizaje de las clonas	48
6.6	Aislamiento y purificación del plásmido	49
6.7	Secuenciación tipo Sanger y análisis bioinformático	49
7.	RESULTADOS.....	50
7.1	Diseño de oligonucleótidos y análisis bioinformático	50
7.2	Extracción de RNA.....	54
7.3	Amplificación de la región codificante de <i>eIF4E</i>	55
7.4	Clonación y transformación de células competentes	57
7.5	Tamizaje de clonas	58
7.6	Secuenciación tipo Sanger de los plásmidos recombinantes.....	60
7.7	Análisis <i>in silico</i> para la proteína eIF4E	67

8.	DISCUSIÓN	73
9.	CONCLUSIONES	80
10.	REFERENCIAS	81
11.	ANEXOS	91
	ANEXO 1. Reactivos, cepas y líneas celulares	91
	ANEXO 2. Vector de expresión	92

ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B
AR	Receptor de andrógenos
AP-1	Proteína activadora- 1 factor de transcripción
pb	pares de bases
CM	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDH1	Cadherina 1
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
ECM	Matriz extracelular
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
eIF4E	Factor eucariótico de iniciación de la traducción
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
ER	Receptor de estrógenos
FTO	Gen asociado a la masa grasa y la obesidad
GAPDH	Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa
GATA3	Proteína de unión a dominios con nucleótidos GATA
GLOBOCAN	The Global Cancer Atlas
g	Constante de la fuerza de gravedad
gr	gramos
HER2/ErbB2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
H-E	Hematoxilina-eosina
IARC	International Agency For Research on Cancer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MEK	MAP-quinasa quinasa
MMP	Metaloproteinasas
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
mRNP	Complejos ribonucleoproteicos
µg	Microgramo
µM	Micromolar

mM	Milimolar
μL	Micro litro
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABP	Proteína de Unión a Poli (A)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pI	Punto isoelectrico
PI3K	Fosfoinositol- 3- quinasa
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
Rb	Proteína del Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
SG	Gránulos de estrés
SSA	Secretaría de Salud
SPPS	Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TERT	Telomerasa Transcriptasa inversa
TD	Touchdown
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
T	Temperatura
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de carcinogénesis	8
Figura 2. Alteraciones en la fisiología celular durante el desarrollo tumoral	11
Figura 3. Mortalidad por cáncer de mama y cáncer cervico-uterino en mujeres en México 1955-2008.....	13
Figura 4. Anatomía de la glándula mamaria femenina	15
Figura 5. Clasificación Histológica del cáncer de mama	17
Figura 6. Terapia usada en el cáncer de mama triple negativo (CMTN)	25
Figura 7. Modelo del ciclo del RNAm	30
Figura 8. Gránulos de RNA y su asociación con el microambiente tumoral	33
Figura 9. Estructura del gen <i>eIF4E</i>	34
Figura 10. Localización citogenética del gen <i>eIF4E</i>	34
Figura 11. Resumen de alteraciones en el cáncer para el gen <i>eIF4E</i>	38
Figura 12. Modelo de la sobreexpresión de <i>eIF4E</i> en el proceso de carcinogénesis	39
Figura 13. Clonación de la región codificante de <i>eIF4E</i>	44
Figura 14. Programa empleado para la PCR-TD	47
Figura 15. Análisis de especificidad de los oligonucleótidos para el transcrito maduro que codifica para el gen <i>eIF4E</i>	51
Figura 16. Análisis de especificidad de los oligonucleótidos para el transcrito maduro que codifica para el gen <i>GAPDH</i>	51
Figura 17. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido eIF4E-F	52
Figura 18. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido eIF4E-R	52
Figura 19. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido GAPDH-F	52
Figura 20. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido GAPDH-R	52
Figura 21. Oligonucleótido de eIF4E sentido modificado	53
Figura 22. Análisis de inter-complementariedad para los oligonucleótidos de <i>eIF4E</i>	53

Figura 23. Análisis de inter-complementariedad para los oligonucleótidos de <i>GAPDH</i>	54
Figura 24. Extracción de RNA a partir de líneas celulares	55
Figura 25. Productos de amplificación de la región codificante de <i>eIF4E</i>	56
Figura 26. Purificación de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%	57
Figura 27. Productos de amplificación en orientación correcta e incorrecta para las clonas.	59
Figura 28. Tamizaje de clonas para el plásmido recombinante de <i>eIF4E</i>	60
Figura 29. Análisis de la clona 1 con el programa MEGA6.....	62
Figura 30. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 1	63
Figura 31. Electroferograma de la secuenciación para la clona 1	63
Figura 32. Análisis de la clona 2 con el programa MEGA6	64
Figura 33. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 2	65
Figura 34. Electroferograma de la secuenciación para la clona 2	65
Figura 35. Análisis de la clona 3 con el programa MEGA6	66
Figura 36. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 3	67
Figura 37. Electroferograma de la secuenciación para la clona 3.....	67
Figura 38. Secuencia traducida para las clonas 1 y 2.....	69
Figura 39. Alineamiento con BLAST (blastx) para las clonas 1 y 2 de <i>eIF4E</i>	69
Figura 40. Secuencia traducida para la clona 3	70
Figura 41. Alineamiento con BLAST (blastx) para las clona 3 de <i>eIF4E</i>	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los subtipos moleculares y relación con tipos histológicos especiales de cáncer de mama	18
Tabla 2. Subtipos moleculares del cáncer de mamá triple negativo	23
Tabla 3. Componentes proteicos de los Cuerpos P	28
Tabla 4. Componentes de la reacción de la síntesis de cDNA	46
Tabla 5. Programa para la retrotranscripción	46
Tabla 6. Componentes de la reacción de amplificación de la secuencia codificante de <i>eIF4E</i>	46
Tabla 7. Condiciones para la reacción de clonación	48
Tabla 8. Condiciones de reacción para la PCR de colonia	49
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para la región codificante de <i>eIF4E</i> y <i>GAPDH</i>	50
Tabla 10. Dominios de la proteína eIF4E	68
Tabla 11. Características de las secuencias traducidas obtenidas contra la esperada	72

1. RESUMEN

Actualmente el cáncer representa uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, siendo el cáncer de mama (CM) uno de los que presenta mayores índices de incidencia y mortalidad en mujeres de todo el mundo. El progreso en el área de biología molecular ha permitido entender la heterogeneidad de esta enfermedad y sus características moleculares, las cuales son utilizadas en la clínica como una guía para la elección de estrategias de terapia sistémica. Dentro de los diferentes subtipos de CM, se encuentran los tumores que son negativos para el receptor de estrógeno, progesterona y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, conocidos como triples negativos (TN), siendo este tipo de cáncer de los más agresivos clínicamente y con un pronóstico pobre, para los que actualmente no hay terapias dirigidas establecidas.

El factor de iniciación de la traducción eucarionte (*eIF4E*), es un oncogen que se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cáncer incluyendo el CMTN, por lo que desempeña un importante papel en la tumorigénesis y la progresión de la enfermedad. Diversos estudios sugieren que *eIF4E* podría emplearse en la terapia molecular dirigida, no obstante los mecanismos a nivel molecular de la participación de este gen en los procesos oncogénicos aún no han sido descritos.

Por lo anterior en este estudio se llevó a cabo la clonación del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, a partir de líneas celulares de cáncer de mama humano en un vector de expresión, a fin de desarrollar reactivos biológicos caracterizados que permitan posteriormente realizar investigación a nivel bioquímico, celular y molecular y evaluar su participación en la patología molecular del cáncer de mama.

La obtención mediante la reacción de amplificación de los productos esperados para el gen *eIF4E*, permitió realizar su ligación en el vector de expresión y transformar células competentes de *E.coli*, identificando mediante PCR de colonia 3 clonas en la orientación apropiada. Los análisis de las secuencias obtenidas a partir de las 3 clonas mediante secuenciación tipo Sanger, mostraron que 2 de las clonas no presentaron ninguna mutación por lo que dichas clonas no contienen cambios a nivel de aminoácidos, mientras que una de las clonas presenta una mutación de tipo transversión, la cual genera un codón de paro a nivel de proteína.

En conjunto estos resultados indican que mediante la reacción de clonación se pudieron obtener materiales biológicos que resultan funcionales y que permitirán la realización de investigación en estudios posteriores de la participación del gen *eIF4E* en procesos oncogénicos, principalmente en el CMTN.

2. ABSTRACT

Currently the cancer represents one of the most important health problems worldwide, being the breast cancer (BC) one with the highest incidence and mortality in women. Advances in molecular biology have let us to understand the heterogeneity of the disease and its molecular characteristics which has been used as a guide to choosing strategies of systemic therapy. Within the different subtypes of BC, there are tumors which were found to be negative for estrogen receptor, progesterone, and the epidermal growth factor receptor-2, known as triple negative (TN), this type of cancer is the most aggressive clinically and with poor prognosis due to the absence of therapies well targeted.

The eukaryotic translation initiation factor 4E (*eIF4E*), is an oncogene overexpressed in several types of cancer including the TNBC, and therefore has an important role in tumorigenesis and progression of the disease. Several studies suggest *eIF4E* could be used in the directed molecular therapy; however the mechanisms at molecular level of participation of this gene in the oncogenic processes have not yet been described.

Therefore in this study was carried out the cloning of the mature transcript that encodes for the gene *eIF4E*, from cell lines of human breast cancer in an expression vector, in order to develop biological reagents characterized to subsequently carry out research at the biochemical level, cellular and molecular and evaluate its participation in the molecular pathology of breast cancer.

The collection of data through the reaction of amplification products of the expected gene for the *eIF4E*, made it possible to carry out your ligation in the expression vector of competent and transform cells of *E. coli*, identified by colony PCR 3 clones in the proper orientation. The analysis of the sequences obtained from the 3 clones of Sanger sequencing showed that 2 of the clones showed no mutation by what these clones do not contain changes at the level of amino acids, while one of the clones presents a transversion mutation type, which generates a stop codon at the level of protein.

Together, these results indicate that using the cloning reaction are able to obtain biological materials that are functional and will allow the carrying out of research in subsequent studies of the involvement of the gene *eIF4E* in oncogenic processes, mainly in the TNBC.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer

3.1.1 Definición

El cáncer se caracteriza por el crecimiento anormal de células, causado por múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que inducen cambios en la expresión génica, los cuales conducen a un desequilibrio en la proliferación y la muerte celular y en último caso, a la progresión de una población de células que pueden invadir los tejidos y ocasionar metástasis en sitios distantes (Ruddon, 2007).

El cáncer no sólo es una enfermedad sino un amplio grupo de enfermedades, por lo que existen más de 100 diferentes tipos de cáncer, la mayoría de los cuales toman el nombre del órgano o de las células en donde se originan (Nee, 2013). Actualmente el estudio de las características moleculares de cada tipo de tumor, ha llevado a la implementación de tratamientos específicos (Allan & Travis, 2005).

3.1.2 Epidemiología del cáncer

3.1.2.1 *Global*

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, en 2012 se atribuyeron 8.2 millones de muertes y 14.1 millones de nuevos casos, en comparación con los 7.6 millones y 12.7 millones, respectivamente, en 2008 (“OMS | Cáncer”). Los tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados en todo el mundo fueron los de pulmón (1.8 millones, 13.0% del total), mama (1.7 millones, 11.9%), y colorectal (1.4 millones, 9.7%), mientras que las causas más comunes de muerte por cáncer fueron el de pulmón (1.6 millones, el 19.4% del total), de hígado (0.8 millones, 9.1%) y estómago (0.7 millones, 8.8%) (“OMS- Las 10 causas principales de defunción en el mundo”).

A pesar de los grandes esfuerzos en políticas públicas, en investigación y en los avances en el estudio de fármacos contra el cáncer, este problema de salud pública ha ido en aumento, por lo que para 2030 se espera que la incidencia mundial se incremente a 21.7 millones nuevos casos de cáncer y 13 millones de muertes por cáncer, debido

principalmente al crecimiento y envejecimiento de la población (GLOBOCAN IARC, 2012).

Durante las últimas cinco décadas de investigación epidemiológica a nivel internacional, se ha demostrado que la mayoría de los cánceres que son frecuentes en una población, no lo son en otra y que la incidencia del cáncer puede variar con el tiempo. La mayoría de los cánceres más comunes que se producen en el mundo, están estrechamente relacionados con la edad, las exposiciones ambientales y el estilo de vida, mientras que los tumores ocasionados por factores genéticos heredables comprenden cerca del 10% de todos los casos, lo que demuestra que casi la mitad de todos los casos de cáncer en el mundo se pueden prevenir (IARC, 2015). Existen evidencias que muestran disminuciones en la incidencia de cáncer después de intervenciones preventivas, por ejemplo, la disminución en las tasas de cáncer de pulmón y otros cánceres relacionados con el tabaco, por un descenso en el tabaquismo (Eisinger et al., 2015; Morère et al., 2015) y la disminución de las tasas de carcinoma hepatocelular, debido a la vacunación contra el virus de la hepatitis B (Di Bisceglie, 2009; Michielsen & Ho, 2011). Otro ejemplo exitoso de las políticas de intervención, es la disminución de la tasa de mortalidad del cáncer cervico-uterino, debida al escrutinio por la prueba de Papanicolaou y recientemente por la implementación de las vacunas contra diferentes tipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (Miller et al., 2015; Vichnin et al., 2015).

Por lo anterior, es claro que se requiere de una mayor inversión en medidas de prevención, siendo estas últimas un factor imprescindible para la disminución en la incidencia y mortalidad (IARC, 2015).

3.1.2.2 El cáncer como un problema de salud pública en México

En México las muertes por cáncer se han disparado en los últimos 30 años, entre 1980 y 2011 la tasa de mortalidad por cáncer creció 56%, pasó de 39.5 muertes por cada 100 mil habitantes a 61.7 por cada 100 mil habitantes, según la Secretaría de Salud. El cáncer constituye la tercera causa de muerte en el país y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128 mil casos nuevos y el 60% son detectados en etapas avanzadas (SSA-SPPS, 2013).

A pesar de los esfuerzos de las instituciones de salud pública para diagnosticar y atender a las personas con cáncer, muchos mexicanos mueren por esta causa. En 2012 del total de defunciones, 13% se debieron a algún tipo de tumor y de éstas, 93.5% fueron por neoplasias malignas (INEGI, 2014). Los tipos de cáncer con un mayor número de muertes son el de pulmón (9.7%), próstata (8.1%), estómago (8.0%), hígado (7.7%) y mama (7.2%), este último es el tipo de cáncer de mayor incidencia en todo el país (13.8%), seguido por el de próstata (9.5%), cervico-uterino (9.4%), colón (5.8%) y pulmón (5.7%) (GLOBOCAN IARC, 2012).

En México las campañas de información sobre la valoración, protección, intervención y de los tratamientos para cáncer son cada vez más efectivas, pero es innegable que todavía mucha gente fallece por este mal. El sistema de salud en México comprende dos sectores, el público y el privado, entre los programas que atienden a la población sin seguridad social está el Seguro Popular de Salud (SPS), el cual ofrece un paquete de 18 intervenciones de alto costo, dentro de las que se incluye el tratamiento para cáncer en niños, cáncer cervico-uterino y cáncer de mama; las evaluaciones indican que son las familias más pobres las que se han afiliado a este seguro (Dantés et al., 2011). Un estudio hecho por el Instituto Nacional de Salud Pública, señala que poblaciones marginadas en términos sociales, geográficos y económicos, tienen una mayor probabilidad de morir por cánceres prevenibles, lo cual se atribuye a que no se recibe un diagnóstico oportuno y por tanto el tratamiento es tardío (Palacio-Mejía et al., 2009).

3.1.3 Factores de riesgo

El cáncer es causado por diversos factores relacionados al estilo de vida, factores ambientales y factores genéticos (Anand et al., 2008).

Entre los factores asociados al estilo de vida se encuentran, los relacionados con la dieta, la actividad física, el consumo de alcohol y/o tabaco y la salud sexual y reproductiva (Rock et al., 2012). En general, el consumo de una dieta alta en grasas, el sobrepeso, la obesidad, poco o nulo consumo de frutas y vegetales, incrementa el riesgo en el cáncer, de la misma manera muchos de los carcinógenos son ingeridos en la dieta y pueden provenir directamente de los alimentos, de los aditivos alimenticios o de la preparación

de los mismos, como nitratos, nitrosaminas y dioxinas (Greenwald, 1992). Por otra parte, se ha demostrado que las personas que realizan ejercicio regularmente, tienen menor riesgo para ciertas formas de cáncer. Mientras que el consumo de alcohol y/o tabaco y las prácticas sexuales sin protección relacionadas a enfermedades de transmisión sexual, aumentan el riesgo a desarrollar algunos tipos de la enfermedad (Danaei et al., 2005).

Dentro de los diversos factores de riesgo, el medio ambiente está implicado en la causa de la mayoría de los cánceres humanos, causando daño al DNA y diversas mutaciones somáticas patogénicas (Lord & Ashworth, 2012). Dichos factores ambientales se pueden clasificar en químicos, físicos y biológicos. Entre los carcinógenos químicos se encuentran el humo del tabaco, compuestos en el aire por la contaminación como partículas de carbono, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, entre otros (Wogan et al., 2004). Diversos tipos de cáncer son inducidos por agentes físicos como, la radiación ionizante y no ionizante, típicamente de sustancias radioactivas y rayos UV (Belpomme et al., 2007). Así mismo, los factores biológicos más importantes son diversos virus, tales como virus de papiloma humano, virus Epstein Barr, virus hepatitis C y B y algunos otros microorganismos parásitos como *Schistosoma haematobium* y bacterias como *Helicobacter pylori* que participan como carcinógenos (Anand et al., 2008).

Los factores de riesgo de tipo genético están asociados a las mutaciones en las células de cáncer, que cubren una amplia gama de alteraciones en el DNA, incluyendo cambios o alteraciones cromosómicas, así como cambios en las secuencias de nucleótidos. La acumulación de mutaciones es crítica para el desarrollo de cáncer y explica por qué el principal factor de riesgo para esta enfermedad es la edad. Dentro de las alteraciones genéticas que predisponen al cáncer, las mutaciones heredadas representan aproximadamente el 5-10% de los factores de riesgo de todos los cánceres (Herceg & Hainaut, 2007). De la misma manera, numerosas alteraciones epigenéticas en cáncer como las alteraciones en la estructura de la cromatina, la metilación del DNA y la

impronta genómica contribuyen a la progresión de los tumores (Nguyen & Massagué, 2007).

3.1.4 Proceso de Carcinogénesis

El desarrollo y progresión del cáncer es un proceso que ocurre en una serie de pasos de gran complejidad molecular, en donde participan múltiples genes. La carcinogénesis puede dividirse conceptualmente en tres etapas: iniciación del tumor, promoción tumoral y progresión tumoral (Barrett, 1993) (Figura 1).

La primera etapa de la carcinogénesis, la iniciación del tumor es el resultado de alteraciones genéticas irreversibles (Pitot, 1993), donde la célula afectada no constituye una célula neoplásica, pero que después de diversos cambios sucesivos genotípicos y fenotípicos, se comienza a presentar el fenotipo neoplásico (Trosko, 2003). El número de mutaciones que son necesarias para que una célula normal progrese a un cáncer avanzado, han sido sugeridas por modelos matemáticos basados en la relación entre la edad y la incidencia, en donde se propone que para algunas neoplasias se requieren seis o siete mutaciones en genes específicos (Armitage & Doll, 1954; Nordling, 1953). No obstante en el cáncer de colon y pulmón se ha descrito que sólo se requieren tres mutaciones (Tomasetti et al., 2015). En esta etapa de iniciación tumoral, las células pueden permanecer en estado latente durante semanas, meses o años, o pueden crecer de manera autónoma y clonal (Player et al., 2004).

La promoción del tumor comprende la expansión clonal selectiva de células iniciales y la inhibición de la apoptosis (Barcellos-Hoff et al., 2013). Debido a que la tasa de acumulación de mutaciones es proporcional a la tasa de división celular, la expansión clonal de las células iniciales por tanto, produce una mayor población de células que presentan nuevos cambios genéticos (*Holland-Frei Cancer Medicine*, 2003).

El siguiente paso, la progresión tumoral, se caracteriza por la irreversibilidad, la inestabilidad genética, el crecimiento acelerado, invasión, metástasis, y cambios en las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células, así mismo la angiogénesis constituye un suceso esencial para la progresión neoplásica. Así mismo, la generación de microvasculatura (angiogénesis) constituye un proceso biológico esencial

para la progresión neoplásica (Dixon & Kopras, 2004). La progresión tumoral comprende la expresión del fenotipo maligno (cambios morfológicos) y la tendencia de las células malignas para adquirir de manera sostenida características más agresivas con el tiempo como la metástasis, la cual implica capacidad de las células tumorales para secretar proteasas, que permiten la invasión más allá de la ubicación del tumor primario (Holland-Frei Cancer Medicine, 2003).

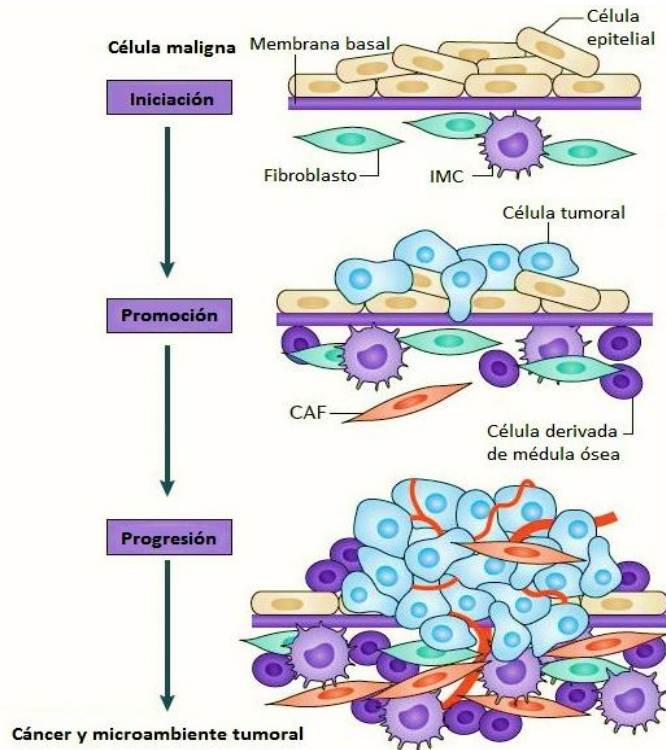


Figura 1. Proceso de carcinogénesis. Se esquematizan los pasos implicados en el proceso de carcinogénesis, iniciación, progresión y promoción tumoral. La carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos en el que las células epiteliales progresan a través de una serie de fenotipos pre-malignos hasta que se desarrolla un cáncer invasivo. CAF, Fibroblasto asociado a cáncer; IMC, célula mieloides inmadura. (Modificada de Barcellos-Hoff et al., 2013).

De la misma manera, las células cancerosas presentan seis alteraciones en la fisiología celular que contribuyen al desarrollo tumoral (Figura 2).

1. Aumento en la producción de señales proliferativas. En el cáncer la disregulación de señales de crecimiento ocurre principalmente por el aumento en

la expresión y secreción factores de crecimiento extracelulares que se unen a receptores de la superficie celular, los cuales contienen típicamente dominios de tirosina quinasa intracelulares. Igualmente los receptores de estos factores presentan mutaciones somáticas que originan defectos en mecanismos de retroalimentación negativa, dando como resultado un aumento o la activación constitutiva de las señales proliferativas. Algunos ejemplos son la desregulación de los receptores EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) y HER2 (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), los cuales activan las vías RAS y del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) favoreciendo la proliferación celular descontrolada (Bardeesy & Sharpless, 2006).

2. Evasión de los supresores de crecimiento. Las células cancerosas también evaden los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de la actividad de genes supresores de tumores como *Rb* y *TP53* (Sherr, 2004).
3. Resistencia a la muerte celular programada (apoptosis). Las células cancerígenas tumorales también son capaces de resistir a la apoptosis a través de un aumento en la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 (proteínas anti-apoptóticas) y la desregulación de las caspasas, así como la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, un gen supresor de tumores y regulador de la apoptosis (Wong, 2011).
4. Incremento en la capacidad replicativa. Las células cancerosas necesitan un potencial de replicación ilimitado para generar tumores macroscópicos. Sin embargo, las células normales en el cuerpo sólo tienen un número limitado de ciclos de división celular. Esta limitación controla el crecimiento de todos los tejidos y se ha asociado con dos barreras distintas a la proliferación: la senescencia y la crisis, las cuales promueven la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011). Así mismo, un mecanismo adicional es la sobreexpresión de la telomerasa, enzima que permite la extensión y mantenimiento indefinido de los telómeros y que aumenta la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis, eventos indispensables para el crecimiento del tumor (Artandi & DePinho, 2010).

5. Angiogénesis. La generación de neovasculatura asociada al tumor. Los tumores activan una mezcla de señales proangiogénicas para la generación de vasos grandes y distorsionados, los cuales presentan un flujo sanguíneo irregular, micro-hemorragias, permeabilidad y permiten niveles anormales de proliferación de células endoteliales. Los principales factores que estimulan la angiogénesis, son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la angiopoyetina-1 (ANG1) (Bergers & Benjamin, 2003).
6. Activación de la invasión tisular y metástasis. Las células tumorales desarrollan típicamente alteraciones moleculares que permiten cambios fenotípicos manifestados en formas celulares de hoz, reducción de la adhesión al tejido epitelial de origen, la destrucción de la membrana basal y la adhesión a la matriz extracelular (ECM) (Nguyen et al., 2009). Estos eventos permiten en la invasión local, la distribución de las células tumorales por vía sanguínea y linfática y finalmente el establecimiento de focos metastásicos en tejidos distantes (Hanahan & Weinberg, 2000).

Actualmente se proponen dos características patológicas adicionales a las células tumorales, (i) la desregulación energética celular (metabolismo), principalmente la del metabolismo de glucosa y su dependencia de otras vías metabólicas alternativas (Jones & Thompson, 2009) y (ii) la evasión de la destrucción celular por el sistema inmune, el cual reconoce y eliminar las células cancerosas (Dunn et al., 2006). Además se han descrito dos características que permiten la adquisición de todas las anteriores, (i) la promoción del tumor mediada por inflamación, en donde se liberan sustancias químicas (citocinas) en el microambiente tumoral, que pueden dar lugar a mutaciones genéticas que permiten y aceleran la formación del tumor (Grivennikov, Greten, & Karin, 2010) y (ii) la inestabilidad genómica, causante del aumento en la tasa de mutaciones, alterando la función celular y contribuyendo a la progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011; Charames & Bapat, 2003).

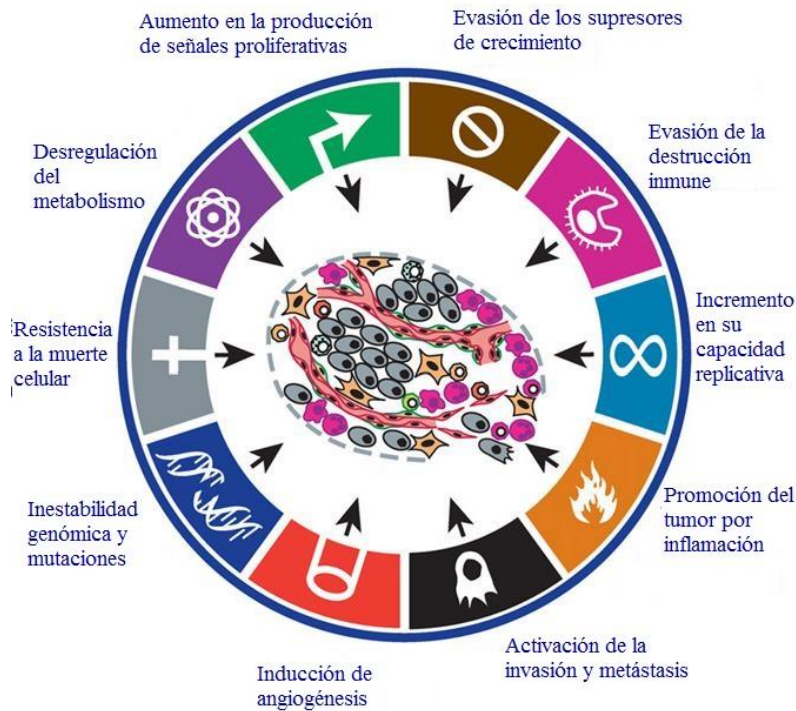


Figura 2. Alteraciones en la fisiología celular durante el desarrollo tumoral. Las células cancerígenas presentan características diferentes en los distintos tipos de tumor, las cuales les permiten crecer y metastatizar a diferentes órganos distantes. Basados en diversos estudios, se han logrado identificar las características más distintivas de las células tumorales. (Modificada de Hanahan & Weinberg, 2011).

3.2 Cáncer de mama

3.2.1 Definición

El cáncer de mama se define como un crecimiento descontrolado de las células del seno. Es una enfermedad compleja y multifacética que abarca una gran variedad de entidades, mostrando una variación considerable en los atributos clínicos, morfológicos, genéticos y moleculares (Vuong et al., 2014).

3.2.2 Epidemiología

En 2012, 1.7 millones de mujeres en el mundo fueron diagnosticadas con cáncer de mama y se registraron 522 mil muertes. Desde el 2008 la incidencia del cáncer de mama ha aumentado en más del 20%, mientras que la mortalidad ha aumentado en un 14%, el cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres y el tipo de cáncer

más frecuentemente diagnosticado entre las mujeres en 140 de 184 países en todo el mundo, representando el 18% de todos los cánceres femeninos. El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en los países menos desarrollados, en parte debido a un cambio en los estilos de vida asociado a factores de riesgo, que provoca un aumento en la incidencia (GLOBOCAN IARC, 2012).

Los datos de salud pública indican que el cáncer de mama en las mujeres ha aumentado, a la par de los costos económicos en los sistemas de salud y los recursos disponibles son limitados. Además la mayoría de las mujeres son diagnosticadas en etapas finales, por lo que no se tiene la posibilidad de aplicar programas de diagnóstico precoz y referencia oportuna para el tratamiento. A nivel mundial se estima que más de un millón de mujeres, son diagnosticadas con cáncer de mama cada año y más de 410,000 morirán a causa de la enfermedad (“OMS | Cáncer de mama”).

En México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel poblacional y en las mujeres, ocupa el primer lugar de mortalidad por cáncer, con 5680 muertes al año y una incidencia de 20,444 nuevos casos (GLOBOCAN IARC, 2012). Las tasas de mortalidad por cáncer de mama muestran un aumento notorio en las últimas cinco décadas, desde el 2006, el cáncer de mama cobra más vidas al año que el cáncer cervicouterino, en contraste con 1980, donde el riesgo de morir a causa del cáncer cervicouterino era dos veces mayor que el de cáncer de mama (SSA, 2013) (Figura 3).

Durante los últimos cinco años, la tasa observada para mujeres de 20 años y más que ha fallecido por cáncer mamario aumentó de 13.92 por cada 100 mil en 2007 a 14.05 en 2011 (INEGI, 2013). El año con más defunciones por esta causa fue 2008 con una tasa de 14.30 de cada 100 mil mujeres de 20 años y más, en ese año murieron 4,818 mujeres mexicanas lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas (Knaul et al., 2009).

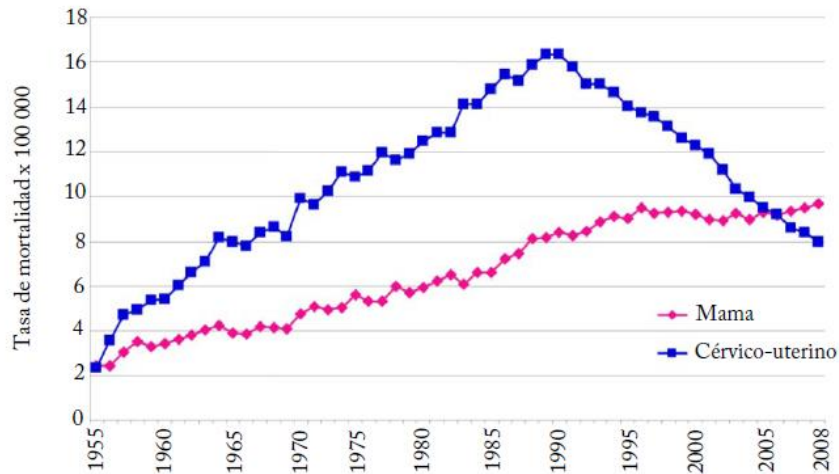


Figura 3. Mortalidad por cáncer de mama y cáncer cervico-uterino en mujeres en México 1955-2008. Tasa por cada 100,000 mujeres ajustada por edad. El cáncer de mama y cervico-uterino representan las dos primeras causas de mortalidad por tumores malignos en mujeres en México, hasta el año 2004 el cáncer cervical era la principal causa de mortalidad, pero a partir del año 2006, el cáncer de mama se vuelve la primera causa de mortalidad por cáncer (Knaul et al., 2009).

La mayoría de las muertes por cáncer de mama pueden evitarse, ya que la evidencia internacional señala que el cáncer de mama es curable si se detecta oportunamente (etapa I) y el tratamiento médico es el adecuado. Un estudio de la Secretaría de Salud de México revela que, hasta dos terceras partes de las muertes por cáncer de mama en mujeres menores de 75 años se pudieron evitar con la detección temprana de la enfermedad y con la aplicación del conjunto de tratamientos médicos que existen para aliviarla. Sin embargo, los datos de acceso y utilización de servicios de salud para el cáncer de mama en México son escasos y aún no se cuenta con un registro nacional de cáncer (SSA, 2013).

3.2.3 Factores de riesgo

El cáncer de mama se presenta con mayor frecuencia en mujeres blancas, seguidas de mujeres negras e hispanas y con menor frecuencia en mujeres asiáticas (Sauter & Daly, 2010). La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, duplicándose cada 10 años hasta la menopausia. Las mujeres que comienzan a menstruar a temprana edad o que tienen una menopausia tardía tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (McPherson et al., 2000). Así mismo la nuliparidad y el primer parto a edad tardía, aumentan la

incidencia de cáncer de mama (Kasum et al., 2014), mientras que la lactancia disminuye el riesgo de cáncer de mama en mujeres que han tenido varios hijos (Sauter & Daly, 2010).

Los antecedentes familiares también constituyen un factor de riesgo, hasta el 10% de cáncer de mama en los países occidentales es debido a la predisposición genética. La susceptibilidad al cáncer de mama generalmente se hereda como una enfermedad autosómica dominante, con penetrancia limitada por una mutación de línea germinal (como *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK 2*, *TP53* o *PTEN*) (McPherson et al., 2000). El síndrome hereditario de cáncer mama, se caracteriza principalmente por la presencia de mutaciones en un par de genes, *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales están situados en los brazos largos de los cromosomas 17 y 13 respectivamente y se ha identificado que representan un muy alto riesgo en el cáncer de mama, ambos genes son muy grandes y las mutaciones pueden ocurrir en casi cualquier posición (Shiovitz & Korde, 2015).

Además del riesgo por la presencia de estos genes en el cáncer de mama hereditario, han sido reportados otros genes que tienen un papel importante en el cáncer de mama esporádico, como *MYC*, *ErbB2* (HER2/neu) *PIK3CA*, *AKT1*, *CDHI*, *GATA3*, *RBI* y *TP53* (Kenemans et al., 2008).

Los efectos proliferativos de las hormonas endógenas apoyan la observación de que la exposición exógena a las hormonas, en forma de anticonceptivos orales, principalmente a estrógeno, se asocia con el riesgo de cáncer de mama. Del mismo modo datos epidemiológicos en todo el mundo, confirman que el uso de la terapia hormonal posmenopáusica se asocia con una mayor incidencia de cáncer de mama (Hanf & Hanf, 2014).

Algunos otros factores de riesgo relacionados al estilo de vida son la nutrición, ya que existe una estrecha correlación entre la incidencia de cáncer de mama y la ingesta de grasas en la dieta de las poblaciones, directamente relacionado con la obesidad (Ghose et al., 2015). Otros estudios también han mostrado una relación entre, el consumo de alcohol y de tabaco y la incidencia de cáncer de mama (McPherson et al., 2000).

3.2.4 Anatomía de las glándulas mamarias femeninas

Las mamas están constituidas por las glándulas mamarias, la piel y tejido conjuntivo asociado (Figura 4). Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas modificadas, que se sitúan sobre la fascia superficial, anteriores a la musculatura pectoral y a la pared torácica anterior, consisten en una serie de conductos y los lóbulos secretorios asociados, éstos convergen para formar de 15 a 20 conductos lactíferos o galactóforos, que desembocan de forma independiente en el pezón, el pezón está rodeado por un área de piel pigmentada denominada areola (Drake, *et al.*, 2010).

Un estroma de tejido conectivo bien desarrollado rodea a los conductos y lóbulos de la glándula mamaria, en ciertas regiones este tejido conjuntivo se condensa para formar ligamentos bien definidos, los ligamentos suspensorios de la mama, (ligamentos Cooper) que se encuentran en continuidad con la dermis y soportan la mama (Tortora y Derrickson, 2006).

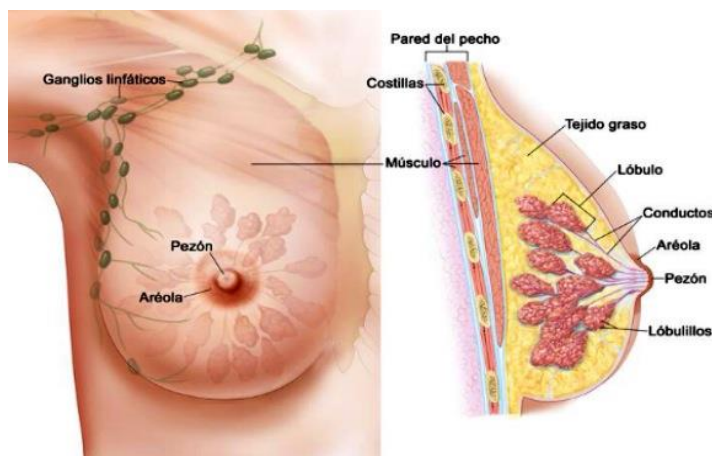


Figura 4. Anatomía de la glándula mamaria femenina. Se muestran el pezón y la areola en la parte externa de la mama, también se muestran los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes internas de la mama femenina (“Diccionario de cáncer”).

Las funciones de las glándulas mamarias son, la síntesis, secreción y eyección de leche, estas funciones son conocidas como lactación y se asocian al embarazo y al parto (Tortora y Derrickson, 2006).

El carcinoma mamario crea tensión en los ligamentos de Cooper, produciendo depresiones de la piel y se ubica de preferencia en el cuadrante superior externo de la glándula, aquel

que contiene la prolongación axilar. Macroscópicamente, se presenta como una masa firme, de tamaño variable, granulosa, de color blanco, seca, con pequeñas estrías o puntos de aspecto cretáceo, su contorno puede ser policíclico o infiltrante. Al microscopio, el carcinoma mamario ha sido clasificado desde muchos puntos de vista: grado de diferenciación tubular, irregularidad o atipia de los núcleos, proporción del tejido conjuntivo acompañante, presencia de receptores hormonales, semejanza de las células tumorales con las normales (Drake *et al.*, 2010).

3.2.5 Clasificación

En base a sus características clínicas, morfológicas, genéticas y moleculares se ha desarrollado un sistema de clasificación para el cáncer de mama.

3.2.5.1 Histológica

Una de las clasificaciones se basa en la apariencia histopatológica del tumor primario. Clínicamente factores como, el grado del tumor (diferenciación), el estadio tumoral (tamaño del tumor y el número de los ganglios linfáticos involucrados) y receptores, junto con la edad del paciente y el estado menopáusico, son utilizados para evaluar el pronóstico, dirigir la terapia y predecir la respuesta al tratamiento (Alizart *et al.*, 2012)

Histológicamente, el cáncer de mama es dividido en carcinoma *in situ* (ductal y lobular) y carcinoma invasivo (infiltrante) (Figura 5). El carcinoma ductal *in situ* (DCIS), es considerablemente más común que el carcinoma lobular *in situ* (LCIS), el DCIS se subdivide a su vez en cinco subtipos: comedo, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido. Similar a los carcinomas *in situ* los carcinomas invasivos se subdividen en: ductal infiltrante, lobular invasivo, ductal/lobular, mucinoso (coloide), tubular, medular y papilar. De éstos, el carcinoma ductal infiltrante es el más común y se subclasifica en bien diferenciado (grado1), moderadamente diferenciado (grado2) o pobremente diferenciado (grado 3); basado en los niveles de pleomorfismo nuclear, formación glandular/ tubular e índice mitótico (Malhotra *et al.*, 2010).

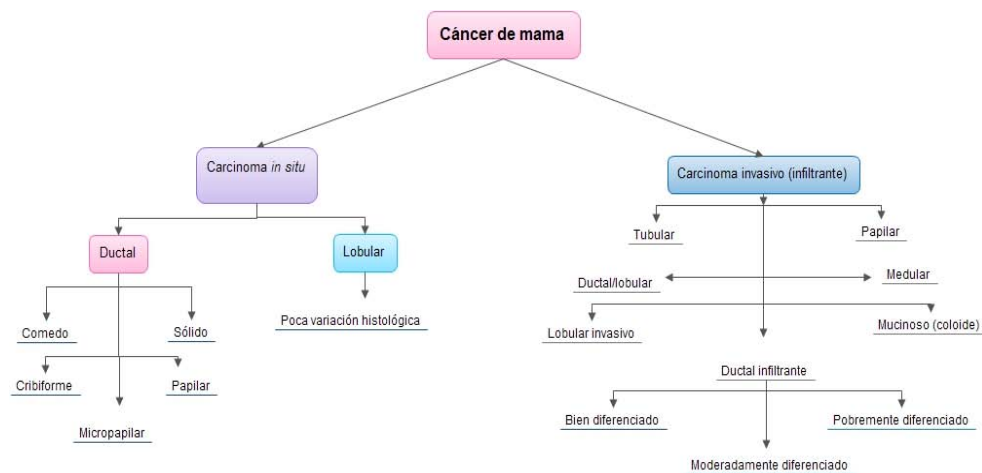


Figura 5. Clasificación Histológica del cáncer de mama. De acuerdo a esta clasificación el cáncer de mama puede ser clasificado en dos grandes grupos carcinoma in situ de tipo ductal o lobular y carcinoma invasivo de tipo tubular o papilar, los cuales a su vez se subdividen en otros subtipos. (Modificada de Malhotra et al., 2010)

3.2.5.2 Biológica

El cáncer de mama se puede clasificar en base a los receptores hormonales, el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y a la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), empleando inmunohistoquímica con un panel de marcadores de anticuerpos (incluyendo ER, PR, HER2, CK5/6 y *EGFR*), en secciones de tejido con hibridación *in situ* (CISH / SISH o FISH), que también se utiliza para evaluar la amplificación del gen HER2, el cual está presente en aproximadamente el 18% de los cánceres de cáncer de mama (Alizart et al., 2012).

La acción del ER está influenciada por receptores de factores de crecimiento tales como, HER2 (a través de Src o MAPK), así como por los complejos ciclina/CDK que modulan la fosforilación y por lo tanto la actividad. De la misma manera, el gen del receptor de progesterona está regulada por el estrógeno (Vuong et al., 2014). Aproximadamente el 40% de los tumores ER positivos son PR negativos, la regulación del PR también está relacionada con la modulación por receptores de factores de crecimiento. Los tumores que son PR negativo, siempre son representativos de una señalización anormal de los factores de crecimiento (Bardou et al., 2003).

En conjunto, estos biomarcadores proporcionan información predictiva respecto al pronóstico y a ciertas terapias elegibles (Viale, 2012).

3.2.5.3 Molecular

A nivel molecular se identificaron diversos subtipos, que fueron confirmados y clasificados como: basal, normal, HER2⁺, luminal (subtipos A y B). Estos subtipos moleculares de cáncer, fueron identificados por análisis de expresión génica basada en microarreglos (Perou et al., 2000).

El grupo basal muestra la mayor diversidad, con respecto a las características histopatológicas, perfiles de mutación, la respuesta a la quimioterapia, el comportamiento metastásico y las tasas de supervivencia. Este subtipo se caracteriza generalmente por la expresión de las citoqueratinas de alto peso molecular CK5/6 y CK14, junto con *EGFR*, *c-KIT*, *FOXCl*, *TP53*, mutaciones frecuentes y un alto índice de proliferación (Badve et al., 2011).

Recientemente, otros subtipos han sido identificados, como baja claudina, apocrino de tipo molecular y grupos relacionados con interferón (Tabla 1). Los tumores de baja claudina suelen ser triple negativo, carcinoma metaplásico y tumores con diferenciación medular (Prat et al., 2010). El grupo apocrino de tipo molecular contiene tumores ER negativo, muestra positividad a AR y características histológicas apocrinas tales como, abundante citoplasma eosinofílico y nucleolos prominentes (Farmer et al., 2005). Los tumores relacionados con el grupo asociado a interferón aún no se han descrito (Weigelt et al., 2010).

Tabla 1. Características de los subtipos moleculares y relación con tipos histológicos especiales de cáncer de mama. (Modificada de Weigelt et al., 2010).

Subtipo molecular	ER, PR, HER2	Marcadores adicionales	Tipos histológicos especiales
Basal	ER- PR- HER2-	CK5/6+ EGFR+	Quístico adenoide, Células acinares Medular, Metaplásico, Lobular pleomórfico, Secretor
HER2/ER-	ER- PR- HER2+	CK5/6+ /- EGFR+/-	Apocrino, Lobular, Micropapilar, Lobular pleomórfico
Luminal	ER+(-)		Apocrino, CDI osteoclástico, Lobular,

	PR+/- HER2-(+)		Micropapilar, Coliideo, Neuroendocrino, Lobular pleomórfico, Tubular
Molecular apocrino	ER- PR- HER2+/-	AR+ CK5/6+ /- EGFR+/-	Apocrino Lobular pleomórfico
Baja claudina	ER- PR- HER2-	CLDN bajo /- CDH1 bajo /- CK5/6+ /- EGFR+/-	Metaplásico Medular (?)
Relacionado con interferón	ER-/+ HER2-	STAT1	Medular (?)
<i>AR: receptor de andrógenos, CDH1: cadherina E, CLDN: Claudina, CK: citoqueratina, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, ER: receptor de estrógenos, CDI: carcinoma ductal invasivo, PR: receptor de progesterona, STAT1: transductor de señales y activador de la transcripción 1. -: negativo, +: positivo, +/-: ocasionalmente positivo; -/+ : raramente positivo.</i>			

3.2.6 Tratamiento

El pronóstico y las opciones de tratamiento dependen de diversas características, como el estadio del cáncer, el tipo de cáncer de mama, los niveles del receptor de estrógeno, de los receptores de progesterona y del receptor (HER2/neu) en el tejido tumoral, la edad de la mujer, la salud general y el estado menopáusico, así como la recurrencia del cáncer (Instituto Nacional de Cáncer (EUA), 2014).

El tratamiento integral del cáncer de mama es multidisciplinario, los manejos locoregional son cirugía y radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa) y el tratamiento sistémico incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares (Arce *et al.*, 2011).

Sin embargo, en los últimos años la descripción de los subtipos moleculares bien definidos de cáncer de mama, junto con la identificación de las alteraciones genéticas de conducción y vías de señalización, ha llevado a la investigación en el desarrollo clínico de un número de agentes moleculares dirigidos, ya que no constituyen una terapia citotóxica como la quimioterapia o radioterapia (Higgins & Baselga, 2011).

La mayoría de los cánceres de mama en el mundo son ER positivo, alrededor del 65 % de los casos de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivos tienen también receptores positivos de progesterona. El desarrollo de terapias para el cáncer de mama con expresión de ER, ha sido uno de los grandes avances clínicos de los últimos 50 años y ha servido como un paradigma para el desarrollo de terapias dirigidas en oncología (Sledge et al., 2014). La terapia anti-estrógeno es la base del tratamiento de los cánceres de mama ER-positivo, estudios realizados muestran que 5 años de tratamiento con Tamoxifen (modulador selectivo del receptor estrogénico) o de inhibidores aromatasa (que bloquean síntesis de estrógeno), reducen el cáncer de mama, la recurrencia y mejoran la supervivencia global en mujeres con cáncer de mama ER positivo en fase inicial y este ha sido el tratamiento por excelencia en todo el mundo (Davies et al., 2013). El tamoxifen es el único agente con eficacia preventiva demostrada en mujeres pre-menopáusicas, el raloxifeno y los inhibidores de la aromatasa son opciones viables en mujeres posmenopáusicas (Freedman et al., 2011).

Sin embargo, sigue existiendo riesgo persistente de la recurrencia del tumor después de los 5 años de tratamiento. Los esfuerzos actuales para mejorar los resultados en atención al cáncer de mama ER-positivo, están orientados a las rutas vinculados a la función ER, como la de PI3K/mTOR y vía de ciclinas, que están frecuentemente mutados en los cánceres ER-positivo (Network, 2012).

Para los pacientes HER2 positivos, se emplea el anticuerpo monoclonal dirigido anti-HER2 trastuzumab. Las investigaciones demuestran que agregar pertuzumab a trastuzumab y el fármaco de quimioterapia docetaxel para el cáncer de mama avanzado, aún no tratado ni con quimioterapia ni con trastuzumab, aumenta la eficacia del tratamiento y alarga la vida con pocos efectos secundarios adicionales, el lapatinib se usa cuando esta terapia ya no es eficaz. Sin embargo, los cánceres generalmente desarrollan resistencia en un cierto plazo (Stearns et al., 2006). El everolimus es otro medicamento empleado este, está dirigido a inhibir mTOR y se emplea en combinación con exemestano para tratar el cáncer de seno avanzado con receptor hormonal positivo y negativo para HER2 (Miller et al., 2009).

No obstante, el conocimiento de los mecanismos de resistencia a la terapia de HER2 (alteraciones de la vía PI3K), es todavía limitado y las aplicaciones clínicas que se

aprovechan de las interacciones con esta y otras vías de factores de crecimiento como *EGFR*, están aún en desarrollo. Por ello se necesitan estudiar nuevos enfoques, tanto de la biología de la enfermedad, como de los ensayos clínicos y el reconocimiento de que la terapia para ser eficaz, debe ser accesible a todos los que sufren la enfermedad (Sledge et al., 2014).

3.3 Cáncer de mama triple negativo

3.3.1 Definición

El cáncer de mama triple negativo (CMTN), representa un grupo de enfermedades heterogéneas que muestran características moleculares, patológicas y clínicas distintas. Fenotípicamente, el CMTN se caracteriza por que carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, ErbB2) (Mancini et al., 2014)

3.3.2 Características

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa aproximadamente el 15% de los cánceres de mama, de estos alrededor del 75% son de tipo basal. Los CMTN son un grupo heterogéneo de tumores con una característica común, un marcado carácter agresivo con mayores tasas de recaída y supervivencia general más corta en el tratamiento del cáncer metastásico en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Abramson et al., 2015).

Las características clínico-patológicas del CMTN incluyen, un tamaño mayor del tumor, mayor grado histológico del tumor, extensa infiltración linfocítica y un mayor pleomorfismo nuclear, la mayoría de los CMTN son de grado histológico III, sin embargo el 10% son de grado I, lo que indica la heterogeneidad del tumor (Xu et al., 2014).

El CMTN se presenta más frecuentemente en mujeres jóvenes (<50 años), premenopáusicas, de etnia Afroamericana o hispana (Liedtke et al., 2013). Otros estudios relacionan el hecho de tener hijos a temprana edad, el sobrepeso, la multiparidad, uso de la lactancia por poco tiempo, uso de métodos para suprimir la lactancia, como factores de riesgo para el CMTN (Anders & Carey, 2009).

Las mutaciones de línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se han asociado con un 15% de CMTN, de los cuales 70% de estos tumores muestran una mutación en el gen de *BRCA1* y 16-23% en el gen *BRCA2*. Así mismo, se han encontrado variaciones en 72 locus identificados en cáncer de mama, que se asocian con CMTN (*TOX3*, *ESR1*, *RAD51L1*, *TERT*, *19p13.1*, *20q11*, *MDM4*, *2p24.1*, *FTO*). Además, la variación en el locus 19p13.1 y en el locus *MDM4* se han asociado con esta forma de cáncer pero no con otras; lo que sugiere que estos locus son CMTN-específicos (Stevens et al., 2013).

Las vías moleculares que se han encontrado alteradas en este tipo de cáncer son el ciclo celular, mecanismos de reparación del DNA, mecanismo de síntesis de nucleótidos, de señalización NF- κ B, respuesta inflamatoria, y angiogénesis (Ossovskaya et al., 2011).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado una asociación del CMTN con la expresión de citoqueratinas 5 y 6 (CK5/6), CK14, CK17, *P-cadherina*, receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), la vía PI3K/mTOR, *PTEN*, las mutaciones y deleciones genómicas en *TP53* y la proteína de retinoblastoma 1 (RB1), son comunes en este subtipo junto con altos índices de proliferación (Abramson et al., 2015).

El análisis de datos genéticos y epidemiológicos para comprender mejor la etiología de esta forma agresiva de cáncer de mama, permite identificar dianas terapéuticas y de prevención, y el desarrollo de modelos de predicción de riesgo (Stevens et al., 2013).

3.3.3 Clasificación molecular

Lehmann y sus colegas, identificaron seis subtipos de CMTN basándose en los patrones de expresión de genes, y evaluando la respuesta a las diversas terapias contra el cáncer en líneas celulares representativas (Tabla 2). Estos datos de cultivos celulares, así como el conocimiento de las principales vías de activación en los diversos subtipos de CMTN se han utilizado para proponer terapias específicas (Lehmann et al., 2011).

Tabla 2. Subtipos moleculares del cáncer de mamá triple negativo. (Modificada de Davis et al., 2014).

Subtipos CMTN	Características moleculares	Terapias potenciales
Basal tipo 1	Función ciclo celular Proliferación Respuesta daño DNA	Quimioterapia Inhibidor PARP
Basal tipo 2	Función ciclo celular Proliferación Señalización factores crecimiento	Quimioterapia Inhibidor PARP
Mesenquimal	EMT Motilidad celular Diferenciación Proliferación	Inhibidor Src Inhibidor vía PI3K Inhibidor vía Wnt
Células madre mesenquimales	EMT Motilidad celular Diferenciación Señalización factores crecimiento Angiogénesis	Inhibidor Src Inhibidor vía PI3K Inhibidor vía Wnt
Luminal receptor de andrógeno	Señalización AR Citoqueratinas luminales	Antagonista AR Inhibidor Hsp90 Inhibidor vía PI3K
Inmunomodulador	Procesos inmunidad celular	Agentes inmunodirigidos
<i>AR, receptor andrógeno; EMT transición epitelio-mesenquimal; PARP Poli (ADP-Ribosa) polimerasa; CMTN Cáncer mama triple negativo.</i>		

3.3.4 Tratamiento

La terapia para el CMTN se basa principalmente en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, porque en la actualidad no existen opciones de tratamiento específicas. Los agentes citotóxicos más empleados son las antraciclinas, taxanos y agentes basados en platino (comúnmente carboplatino y cisplatino) (Engebraaten et al., 2013) (Figura 6). Sin embargo, las células tumorales residuales que se encuentran en la mayoría de los pacientes con esta forma de cáncer, dan lugar a un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad y una fuerte disminución en la supervivencia. En la actualidad, no existen terapias dirigidas para este tipo de cáncer (Hoeflerlin et al., 2013).

La comprensión de las bases moleculares de esta forma de cáncer permite el desarrollo de estrategias terapéuticas con la identificación de dianas moleculares. Algunas de las terapias moleculares más estudiadas son, el papel de la inhibición, del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la inhibición de *erbB*, la inhibición de la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa/AKT/mTOR, de la ruta del receptor tirosina cinasa/RAS/MEK/MAPK, de la ruta *Rb*/genes proliferación (Engebraaten et al., 2013), de la ruta de señalización vía Hedgehog, vía de Notch y la vía intrínseca de la apoptosis (O'Toole et al., 2013). Además la sobreexpresión de *EGFR*, es más común en los cánceres de mama triple negativo que en otros subtipos y el uso del anticuerpo monoclonal cetuximab, dirigido contra *EGFR* se está estudiando en combinación con carboplatino (Foulkes et al., 2010).

Uno de los estudios más prometedores en los últimos años es el estudio de fase III aleatorizado BEATRICE, que examinó si bevacizumab podría mejorar las tasas de recaída cuando se administraba durante 1 año, además de la quimioterapia adyuvante estándar en las primeras etapas de cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, no se encontró evidencia de un efecto de bevacizumab en pacientes con CMTN (Cameron et al., 2013).

En la actualidad, aún no existen estudios concluyentes para el uso de terapias dirigidas en el CMTN (Engebraaten et al., 2013). Una mayor comprensión de la complejidad y de los mecanismos que se relacionan con el CMTN, proporcionará los biomarcadores que

predigan la sensibilidad a estos tratamientos y que permitan la implementación de estas estrategias terapéuticas en la clínica (O’Toole et al., 2013).

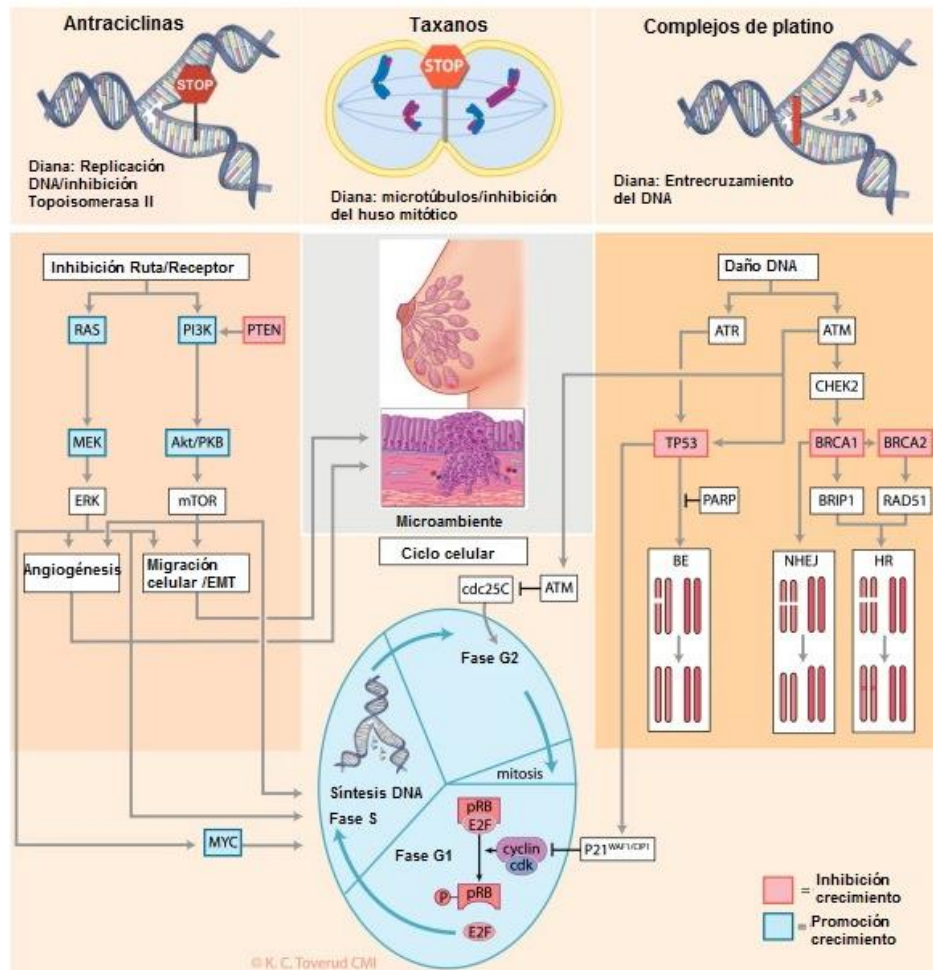


Figura 6. Terapia usada en el cáncer de mama triple negativo (CMTN). La terapia más frecuente usada en el CMTN incluye antraciclinas, taxanos y agentes basados en platino, la combinación de estas terapias con terapias moleculares dirigidas que se han estudiado en diferentes vías, podrían ser más eficaces, sin embargo aún no existen estudios concluyentes (Modificada de Engebraaten et al., 2013).

3.4 Cuerpos de Procesamiento

Durante la progresión del cáncer, los procesos post-transcripcionales y post-traduccionales tienen un papel central en la regulación de la expresión de génica. Dentro de estos procesos los compartimentos citoplásmicos conocidos como “cuerpos de procesamiento”, participan en la patología molecular del cáncer (Eulalio et al., 2007).

3.4.1 Generalidades

En las células de mamíferos, incluyendo a los humanos, se presentan estructuras citoplasmáticas formadas por gránulos que contienen RNAm reprimido traduccionalmente (Olszewska et al., 2012). Estos agregados macromoleculares se denominan gránulos de RNA, los cuales incluyen los “Cuerpos de procesamiento” (Cuerpos P) y los gránulos de estrés (SG) (Thomas et al., 2011). Los Cuerpos P son gránulos citoplásmicos de agregados de RNAm y proteínas específicas que participan en los procesos de degradación, de represión traduccional y almacenamiento de RNAm (Olszewska et al., 2012).

Los cuerpos P fueron descubiertos en 1997, cuando se reportó que *XRN1* la principal exoribonucleasa en las células eucariontes, estaba localizada en pequeñas estructuras granulares en el citoplasma de células de mamíferos; sin embargo, su importancia biológica permaneció poco apreciada (Bashkirov et al., 1997). En 2002 los cuerpos P, fueron redescubiertos gracias a un suero autoinmune de un paciente que sufría de neuropatía motora y sensorial. Este suero teñía de manera discreta los dominios citoplasmáticos y se encontró una nueva proteína humana de función desconocida *GW182* (llamada así por su peso molecular y la presencia de glicina y repeticiones de triptófano) (Eystathioy et al., 2002). En 2002 y 2003, se demostró tanto en levaduras como en células de mamíferos, que la enzima Dcp2 y su coenzima asociada Dcp1, así como el complejo Lsm1-7 y Xrn1 se encontraban en estos cuerpos citoplasmáticos. Por otra parte, se encontraron estos componentes en células HeLa y células de levadura, mostrando una localización común (Ingelfinger et al., 2002). La comprensión inicial de la composición, la dinámica y las posibles funciones de estos cuerpos citoplasmáticos provino de experimentos realizados en células de levadura (Sheth & Parker, 2003).

3.4.2 Diferencias con los gránulos de estrés

En células de mamíferos los gránulos de estrés pueden distinguirse claramente de los cuerpos P, aunque ambos contienen gránulos de RNA reprimidos, por microscopía de luz un pequeño número de cuerpos P se detectan en la mayoría de las células somáticas en condiciones normales (2-10 por célula), mientras que los SG sólo surgen en respuesta a condiciones de estrés, por tanto los cuerpos P no dependen de los SG para su ensamble (Kedersha et al., 2005). La microscopía electrónica de cuerpos P muestra que éstos son

estructuras compactas, con subestructura densa, que pueden contener un componente fibrilar, mientras que los SG son más grandes, irregulares, y con estructuras granulares, pero ambas estructuras carecen de cualquier membrana limitante (Souquere et al., 2009).

Además, ambas estructuras se pueden distinguir porque numerosas proteínas son específicas para cualquiera de las dos, para los SG los factores de traducción (como eIF3B, eIF4A, eIF4G), *PABP* y *G3BP* pueden usarse como marcadores específicos, mientras que para los cuerpos P, los componentes de la maquinaria de degradación del RNA citoplasmático como Dcp2, Dcp1 o Hedls sirven como proteínas marcadoras (Anderson & Kedersha, 2009).

Aunque los Cuerpos P y los SG pueden contener las mismas especies de RNAm, los dos compartimentos difieren con respecto al estado del RNAm que contienen, en los SG los RNAm están poliadenilados y en los Cuerpos P los RNAm carecen de una cola de poli (A) (Zheng et al., 2008). Esta diferencia indica que los RNAm de los SG no están sujetos a la degradación inmediata, sin embargo en los Cuerpos P, la mayoría de los RNAm parecen estar destinados específicamente para la degradación (Sheth & Parker, 2003).

Por otro lado, en ciertos tipos de estrés se puede observar con frecuencia Cuerpos P agrupados en torno a SG. Por ejemplo, el tratamiento de diversas líneas celulares humanas con arsenito de sodio hace que muchos Cuerpos P, puedan agruparse alrededor de SG, cuando se examinan mediante microscopía electrónica los SG y los Cuerpos P se encuentran en estrecha proximidad, pero los Cuerpos P conservan su estructura densa en comparación con la apariencia más granular de los SG (Souquere et al., 2009). En contraste, el estrés por choque térmico o clotrimazol induce la formación de SG, pero no causa una asociación de los SG con Cuerpos P (Kedersha et al., 2005). Lo anterior sugiere que existen componentes celulares que enlazan a los Cuerpos P con los SG bajo condiciones específicas.

3.4.3 Composición

En los últimos años, el número de proteínas detectadas en los Cuerpos P ha aumentado exponencialmente (Tabla 3). Además de las proteínas que están implicadas en la degradación del RNAm, los componentes de los Cuerpos P incluyen proteínas con

funciones en la vigilancia de RNAm, RNA de interferencia y la represión traduccional. La presencia de proteínas que funcionan en una amplia gama de procesos de post-transcripcionales indica un papel central para los Cuerpos P en la regulación de la expresión génica (Eulalio et al., 2007).

Tabla 3. Componentes proteicos de los Cuerpos P. (Modificada de Eulalio et al., 2007).

Nombre	Función	Organismos	Efectos
XRN1, ScKem1	Exonucleasa 5'→3'	Humano, ratón, <i>Sc</i>	Disminución: Aumento en el tamaño y número de cuerpos P (<i>Sc</i>)
GW182, CeAIN-1	Ruta de miRNA	Humano, <i>Dm</i> , <i>Ce</i>	Disminución: Pérdida de cuerpos P (humano)
DCP2, CeDCAP-2	Enzima de eliminación de la caperuza 5'	Humano, <i>Dm</i> , <i>Ce</i> , <i>Sc</i>	Disminución: Incremento en el tamaño y número de cuerpos P(humano); sobreexpresión: pérdida Cuerpo P(humano)
DCP1, CeDCAP-1	Subunidad enzimática de eliminación de caperuza 5'	Humano, <i>Dm</i> , <i>Ce</i> , <i>Sc</i>	Disminución: Aumento en el tamaño y número de cuerpos P (<i>Sc</i>)
Hed1s, Ge-1	Co-activador: eliminación caperuza 5'	Humano, <i>Dm</i>	Disminución: Incremento en el tamaño y número de cuerpos P(humano); sobreexpresión: pérdida cuerpos P(humano)
EDC3	Co-activador eliminación caperuza 5'	Humano, <i>Dm</i> , <i>Sc</i>	Sobreexpresión: pérdida cuerpos P(humano)
LSm1-7	Complejo co-activador eliminación caperuza 5'	Humano, <i>Sc</i>	Disminución: pérdida cuerpos P(humano), pero incrementa el número de cuerpos P (<i>Sc</i>)
RAP55 (LSm14)	Co-activador predictivo eliminación caperuza 5'	Humano	Disminución: pérdida cuerpos P
RCK/p54, DmMe31B,	Co-activador	Humano, <i>Dm</i> ,	Disminución:

CeCGH-1, ScDhh1	eliminación caperuza 5', regulador traducción	<i>Ce, Sc</i>	pérdida cuerpos P (humano y <i>Sc</i>); Sobreexpresión: Incremento en el tamaño y número de cuerpos P (humano) pérdida cuerpos P(<i>Sc</i>)
eIF4E	Factor eucariótico de iniciación de la traducción	Humano, rata	No determinados
eIF4E-T	Represión traducción	Humano	Disminución: pérdida de cuerpos P
Proteínas Argonauta	En las rutas de siRNA y miRNA	Humano, <i>Dm, Ce</i>	No determinados
APOBEC3G y APOBEC3F	Desoxicitidina desaminasa con actividad antiviral	Humano	No determinados
<i>Ce, Caenorhabditis elegans; Dm, Drosophila melanogaster; eIF4E, Factor eucariótico iniciación traducción-4E; eIF4E-T, eIF4E-tansportador; miRNA, microRNA; ; Sc, Saccharomyces cerevisiae; siRNA, RNApequeño interferente ;</i>			

3.4.4 Formación

Los análisis de Cuerpos P y gránulos de estrés (SG) sugieren un modelo para el metabolismo de RNAm citoplásmico, denominado el ciclo del RNA (Figura 7). En este modelo, los RNAm presentes en polisomas pasan por ciclos repetidos de iniciación de la traducción, elongación y terminación para producir polipéptidos (Balagopal & Parker, 2009).

En una primera fase se da un proceso de deadenilación, que es iniciado cuando PABP unido a la cola de poli(A) interactúa con Pan3 para incorporar la deadenilasa Pan2. Después factores de traducción como eIF4G, eIF4E, eIF3, eIF2 y ribosomas pueden disociarse de los complejos ribonucleoproteicos (mRNPs), lo que permite que se asocien con los Cuerpos P, los mRNPs pueden ser liberados de los Cuerpos P para su traducción o permanecen en éstos para ser deadenilados por el complejo Ccr4-CAF1, lo que resulta en la incorporación de factores de degradación de la caperuza 5' del RNAm, como Lsm1-7 (Zheng et al., 2008).

En otra vía, los RNAm que se encuentran en polisomas interactúan con las proteínas que reprimen la iniciación de la traducción tales como Dhh1/Rck y Pat1. En esta etapa, se prevé una competencia cinética entre procesos pre-traduccionales y pos-traduccionales y la

agregación de mRNPs en Cuerpos P. Una vez que Dhh1 y Pat1 actúan sobre el RNAm, se incorpora el complejo Dcp1/Dcp2, Lsm1-7 y otros factores que eliminan la caperuza 5' del RNAm y da lugar al ensamblaje del Cuerpo P y una posterior degradación del RNAm (Balagopal & Parker, 2009).

Este modelo cinético de ensamblaje de Cuerpos P sugiere que la formación de Cuerpos P es directamente proporcional a la concentración citoplasmática de mRNPs traduccionalmente reprimidos (Franks & Lykke-Andersen, 2008).

Dos componentes proteicos de los Cuerpos P, Edc3 y Lsm4 fueron identificados como factores que promueven las interacciones entre mRNP, necesarias para el ensamblaje de Cuerpos P (Decker et al., 2007), también se encontró que en líneas celulares de *Drosophila* y humanos, la disminución de los factores Hedls o GW182 conduce a la pérdida de Cuerpos P. Sin embargo, no se ha determinado si esto es debido a un efecto directo en la etapa del ensamblaje de Cuerpos P, en lugar de un efecto indirecto de la modulación de la traducción o de degradación del RNAm (Jakymiw et al., 2005). Por otra parte la sobreexpresión de Hedls, provoca la agregación de Cuerpos P en células humanas, lo que soporta la idea de que diferentes vías de represión de mRNP utilizan diversos complejos de proteínas para el ensamblaje de Cuerpos P (Franks & Lykke-Andersen, 2008).

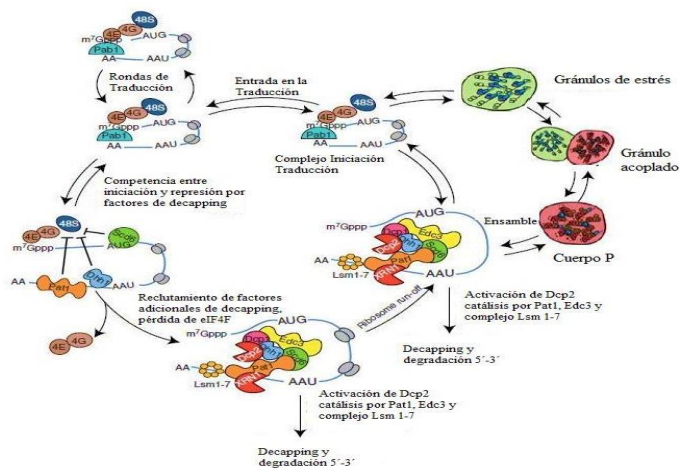


Figura 7. Modelo del ciclo del RNAm. Este modelo explica la formación de los Cuerpos P por un ensamblaje de tipo cinético, donde hay un movimiento dinámico del RNAm entre polisomas, Cuerpos P y gránulos de estrés, el RNAm que se dirige a los gránulos de RNA puede ser reprimido ya sea en la traducción, degradado 5'-3' o almacenado para su posterior uso. (Modificada de Decker & Parker, 2012).

3.4.5 Participación en procesos celulares

Se ha descrito que los Cuerpos P están asociados con el retículo endoplásmico y/o mitocondrias, y que pueden participar en la traducción y/o degradación del RNAm relacionado con estos organelos (Huang et al., 2011). Alternativamente estos cuerpos de procesamiento podrían llevar el RNAm a estos sitios, por lo que los Cuerpos P desempeñan un papel importante en el transporte intracelular ya que se asocian con componentes del citoesqueleto, como actina y microtúbulos, la asociación con los microtúbulos está relacionada con la dinámica de ensamble del Cuerpo P. Por lo que la agregación de mRNPs en los cuerpos P, puede estar dada por la integridad de los microtúbulos (Kedersha et al., 2005).

Se sabe que una variedad de procesos celulares alteran la dinámica de formación de los Cuerpos P, uno de estos procesos celulares es el ciclo celular, por ejemplo en las células HeLa, el ensamble de Cuerpos P fue estimulado en la parte final de las fases S y G2 del ciclo celular y reprimido en la fase S temprana, los Cuerpos P se desensamblaron durante la mitosis y reaparecieron a finales de la fase G1 y las células proliferantes mostraron Cuerpos P más visibles en comparación con células quiescentes. Esto también se observó en células T y esplenocitos de ratón, en el que los Cuerpos P se depletaron en la privación de suero y se re-ensamblaron cuando se volvió a adicionar suero al medio (Yang et al., 2004). Una correlación entre los Cuerpos P y la proliferación celular, también se ha observado en células de la línea germinal. Estos estudios muestran que los Cuerpos P pueden participar como reguladores de la expresión génica, y esta función podría ser más importante en condiciones de estrés (Swetloff et al., 2009).

3.4.6 Participación en procesos oncogénicos

Los gránulos de RNA contienen cientos de diferentes moléculas, por ejemplo, uno de sus componentes proteicos el factor de iniciación de la traducción eucariote (*eIF4E*), presenta alteraciones en su expresión en diferentes tipos de tumores. No obstante, la participación directa de los gránulos de RNA en el metabolismo del cáncer, así como la regulación de la expresión génica en las células de cáncer y la adaptación de células cancerígenas a microambientes tumorales, todavía no se ha descrito (Anderson et al., 2014) (Figura 8).

La formación de SG y Cuerpos P está dada por una respuesta integrada al estrés (RIS) que promueve la adaptación y la supervivencia durante el cambio de las condiciones del microambiente (Donnelly et al., 2013). La RIS es un programa que recibe información de diferentes "sensores de estrés" y coordina la adaptación celular a estrés (Anderson & Kedersha, 2009). Entre los sensores de estrés están las cinasas de serina y treonina quinasas que fosforilan eIF2 α . La fosforilación de eIF2 α es el principal desencadenante de la formación de SG (Donnelly et al., 2013).

El microambiente tumoral cambia dinámicamente durante la progresión tumoral, lo que requiere una adaptación constante de las células cancerosas por el cambio en las condiciones intracelulares y extracelulares (Anderson et al., 2014). La hipoxia y la falta de nutrientes alteran el metabolismo celular, causando finalmente la producción de ROS que tienen efectos múltiples en la fisiopatología de las células del cáncer (Costa et al., 2014). El estrés a nivel de retículo endoplásmico resulta en un desequilibrio en el aumento de la síntesis de proteínas, debido a la sobreproliferación de células cancerígenas (Clarke et al., 2014). Este estrés celular, a menudo aumentado por la quimioterapia, da lugar al aumento en la formación de Cuerpos P y SG (Kaehler et al., 2014).

La integración y el balance de estas respuestas asociadas a estrés, se modulan mediante múltiples respuestas fisiológicas a través de SG y Cuerpos P, incluyendo la activación de mecanismos anti-apoptóticos, mecanismos de pro-supervivencia, el aumento en el crecimiento del tumor, la modulación de la respuesta inmune, la promoción de la angiogénesis y/o la activación de la "transición epitelio-mesenquima" (EMT) (Pan et al., 2012).

Múltiples Proteínas de unión al RNA con propiedades de señalización (AGO2, RCK, TTP, YB-1, G3BP) y moléculas de señalización (RACK1, TRAF2, Raptor, mTOR), se asocian dinámicamente con los SG y Cuerpos P. Estos componentes pueden transducir señales de entrada al microambiente tumoral para las respuestas fisiológicas, mediando así ambas adaptaciones a corto y largo plazo para el crecimiento tumoral y la metástasis. La comprensión de las funciones de los gránulos de RNA en el metabolismo de células cancerosas, puede contribuir a identificar aspectos importantes para la terapia del cáncer (Anderson et al., 2014).

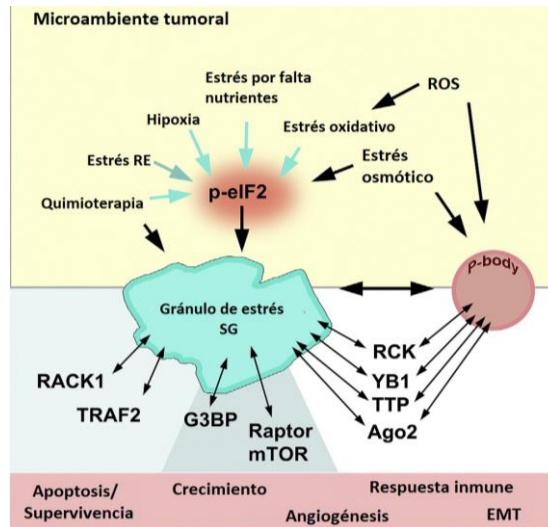


Figura 8. Gránulos de RNA y su asociación con el microambiente tumoral (Modificada de, Anderson et al., 2014). Las células cancerosas están expuestas a condiciones adversas en el microambiente tumoral y utilizan mecanismos de control post-transcripcional para reprogramar la expresión génica de y mejorar la supervivencia celular. Los gránulos de estrés y los cuerpos P, son gránulos de RNA que contribuyen a este proceso mediante la modulación de las vías de señalización celular, la maquinaria metabólica y los programas de respuesta al estrés.

3.5 *eIF4E*

3.5.1 Características

El factor de iniciación de la traducción eucariote (*eIF4E*), es un componente central en la iniciación y regulación de la traducción en células eucariotas. A través de su interacción con la estructura denominada caperuza (cap) 5' del RNAm, la función de *eIF4E* es reclutar el RNAm al ribosoma (Joshi et al., 2004).

El factor *eIF4E* fue descubierto por Witold Filipowicz en 1976, como una proteína citoplasmática de unión a la estructura 5' cap del RNAm en la traducción. Inicialmente se descubrió como un solo polipéptido (Filipowicz et al., 1976), posteriormente, el Dr. Sonenberg y su equipo descubrieron la función y el control de *eIF4E* por las vías de señalización implicadas en 4E-BPs y la fosforilación de *eIF4E*, para ello, emplearon reticulocitos de conejo y ribosomas de ratón para determinar la capacidad unión a la estructura 5'cap del RNAm, (Sonenberg et al., 1978), después se purificó el polipéptido mediante cromatografía de afinidad (Sonenberg et al., 1979), más tarde la proteína fue denominada *eIF4E* (Sonenberg et al., 1980).

El gen *eIF4E* tiene más de 50 kpb y contiene 7 exones (Figura 9) y su localización a nivel citogenético es 4q23 (Figura 10). Este gen presenta 3 variantes, la isoforma 1 con 4749 nucleótidos, que codifican para una proteína de 217 aa, la variante 2 tiene 4842 nucleótidos, debido a que contiene un exón adicional y codifica para una proteína de 248 aa, con un extremo C-terminal más largo en comparación con la isoforma 1, y la variante 3 es de 3406 nucleótidos de longitud y utiliza un exón alternativo para la región 5' UTR y la región 5' de codificación, codifica para una proteína de 237 aa y una región N-terminal distinta en comparación con la isoforma 1. La transcripción de las variantes 2 y 3 se predijo a partir de secuencias de cDNA, pero no existen estudios acerca de su expresión en el RNAm o a nivel de proteína (Borden *et al.*, 2011).

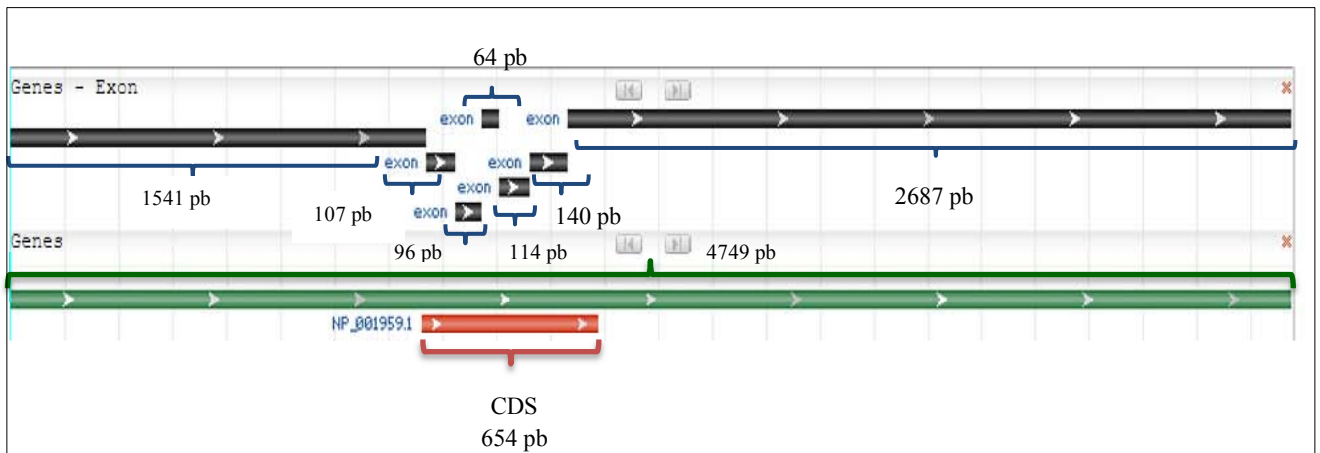


Figura 9. Estructura del gen *eIF4E*. Se esquematiza la estructura del gen *eIF4E*, donde se aprecia el tamaño del gen de 4749 pb (verde), los exones y su tamaño correspondiente, y la región codificante (CDS) de 654 pb (rojo) (Modificada de GenBank, NCBI).

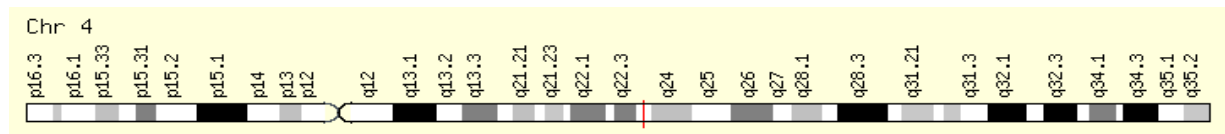


Figura 10. Localización citogenética del gen *eIF4E*. El gen *eIF4E* a nivel citogenético se localiza en el brazo largo del cromosoma 4 en la región 2, banda 3 (Safran *et al.*, 2002).

El factor *eIF4E* forma parte del complejo multimérico *eIF4F*, que además de *eIF4E*, contiene una helicasa de RNA dependiente de ATP, *eIF4A*, una proteína de unión al RNA, *eIF4B* y el factor *eIF4G* que tiene sitios de unión específicos para *eIF3*, *eIF4A*, *eIF4E* y la

proteína de unión a poli-A (Gao et al., 1998). El ensamble de éste complejo, es inhibido por una familia de represores denominadas proteínas de unión a eIF4E, 4EBPs, las 4EBPs (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3) son proteínas termoestables pequeñas que inhiben la traducción dependiente de cap (Mamane et al., 2004).

Actualmente se han identificado tres diferentes miembros de la familia eIF4E en mamíferos denominados eIF4E-1, eIF4E-2 (4EHP, 4E-LP) y eIF4E-3, los cuales difieren en sus dominios estructurales, sus características funcionales y patrones de expresión. El gen eIF4E-1, se encuentra en todos los eucariontes, los ortólogos de eIF4E-2 están restringidos a los metazoarios, mientras que eIF4E-3 se ha encontrado sólo en cordados. El gen eIF4E-2 se encuentra de forma constitutiva en diversos órganos y tejidos, mientras que eIF4E-3 sólo se ha detectado en corazón, músculo esquelético, pulmón y bazo, de manera similar a eIF4E-1. Se propone que cada miembro de la familia eIF4E, puede tener una función especializada en el reclutamiento de los RNAm por los ribosomas, a través de las diferencias en su capacidad para unirse al 5' cap y/o la interacción con eIF4G y 4E-BP, ya que eIF4E-2 no interactúa con eIF4G y eIF4E-3 no interactúa con 4E-BP; sin embargo dicha función o regulación en la iniciación de la traducción por parte de estos miembros de la familia eIF4E, aún no se ha determinado (Joshi et al., 2004).

El promotor del gen *eIF4E* carece de una caja TATA canónica, pero contiene un elemento polipirimidina en la posición -25, llamado elemento basal *eIF4E* (4EBE) que se une a una ribonucleoproteína heterogénea-nuclear del grupo K (hnRNP-K). La hnRNP-K interactúa con la proteína de unión a TATA y la recluta al promotor, lo que explica como 4EBE puede sustituir a la caja TATA en el promotor *eIF4E* (Lynch et al., 2005). En el mapeo del promotor de *eIF4E* se encontró que contenía repeticiones de la secuencia E-box, CACGTG en las posiciones -77 y -232 que son sensibles a *c-myc*, los mismos elementos se superponen a la unión del factor estimulante corriente arriba (USF). Estudios de mapeo posteriores encontraron elementos de unión a AP-1 implicados en la regulación transcripcional de eIF4E en las células del músculo cardíaco (Makhlouf et al., 2001), así como Rel, Myb, NF-κB, SP-1, NF1, STAT, AP-4, ATF y CREB en motivos con secuencias consenso presentes en la región 5' del gen (Zhu et al., 2005). De la misma manera, se ha demostrado que el RNAm de *eIF4E* contiene elementos ricos en AU en la

región 3'UTR responsables de la unión y estabilización mediada por la proteína HuR (Topisirovic et al., 2009).

3.5.2 Localización y participación en procesos celulares

El factor *eIF4E* se localiza tanto en el citoplasma, como en el núcleo de la célula, hasta el 68% de *eIF4E* se encuentra en el núcleo de las células en una amplia variedad de especies que van desde la levadura a los seres humanos. En el citoplasma, la proteína de unión a m7G cap eIF4E, participa en la iniciación de la traducción dependiente de cap. A nivel nuclear participa en una variedad de eventos de procesamiento de RNA incluyendo el transporte de citoplasma-núcleo, regulación de elongación del RNAm y en la regulación de la expresión génica a nivel pos- transcripcional (Strudwick & Borden, 2002).

El factor eIF4E en mamíferos, pesa 25 kDa y por medio de cristalografía de rayos X se encontró que su estructura tridimensional se compone de ocho de cadenas hoja beta anti-paralelas apoyadas por tres hélices alfa (Tomoo et al., 2002). Tiene dos residuos de Trp (Trp56 y Trp102 para *eIF4E* humano), que mantienen protegida el residuo de guanina del cap (McCoy et al., 1997), un tercer residuo Trp (Trp166 en *eIF4E* humana) reconoce la presencia del grupo N7-metil de la estructura del cap. Además se ha encontrado que eIF4E interactúa con las quinasas Mnk1 y Mnk2 (Marcotrigiano et al., 1997).

Su capacidad para regular la síntesis de proteínas está dada por al menos tres procesos. En primer lugar, la fosforilación de eIF4E correlaciona con la tasa de traducción en un gran número de sistemas y aumenta la afinidad de la proteína para los análogos de cap de 3 a 4 veces. En segundo lugar, la disponibilidad eIF4E está regulada por proteínas de unión a eIF4E, las cuales son fosforiladas en respuesta a la insulina y otros mitógenos, lo que las libera de eIF4E, permitiendo la unión de eIF4E a eIF4G (M. Gao et al., 1998). La proteína blanco del fármaco rapamicina en los mamíferos (mTOR) es la cinasa que fosforila 4EBPs, interactúa además con PI3K y cataliza fosforilaciones posteriores que conducen a la disociación de 4EBP de eIF4E. En tercer lugar, los niveles de eIF4E están regulados a nivel transcripcional (Hsieh & Ruggero, 2010).

El gen *eIF4E* se expresa de forma ubicua, y su presencia es esencial para la viabilidad de las células y organismos. Los cambios en los niveles intracelulares de *eIF4E* tienen un

profundo efecto en el control del crecimiento celular y su desregulación se traduce en procesos oncogénicos (Miyagi et al., 1995). Estudios en el genoma de pacientes con autismo han demostrado la relación de la región que contiene el locus en el cromosoma 4q con *eIF4E* con este padecimiento (Schellenberg et al., 2006).

3.5.3 Participación en Cuerpos de Procesamiento

Los cuerpos de procesamiento en humanos, excluyen generalmente los factores de iniciación de la traducción y proteínas ribosomales con excepción de eIF4E y el factor relacionado a su transporte (eIF4E-T) (Cargnello et al., 2012). La presencia de eIF4E, evidencia que los RNAm son almacenados en los Cuerpos P en forma de un mRNP. Por su parte el factor eIF4E-T desempeña un papel en el transporte núcleo-citoplasma de eIF4E, y podría contribuir a una posible función de eIF4E en el núcleo (Ferraiuolo et al., 2005).

Algunos estudios indican que eIF4E interactúa con eIF4E-T y el complejo Dhh1 (RCK/p54) en Cuerpos P *in vivo*. El uso de RNAs interferentes reveló que un subconjunto de factores en los Cuerpos P, incluyendo eIF4E-T, Lsm1-7, Dhh1 (RCK/p54), y Ccr4 son necesarios para la acumulación de eIF4E en Cuerpos P y la sobreexpresión de Dcp1 aumenta la acumulación de eIF4E en Cuerpos P (Andrei et al., 2005). Se encontró que eIF4E puede interactuar con Dhh1 en los Cuerpos P, proporcionando un enlace desde el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), a la estructura del cap 5' de los RNAm (Eulalio et al., 2007).

De la misma manera se encontró que la sobreexpresión de eIF4E-T en células HeLa causa un marcado incremento de eIF4E en Cuerpos P; eIF4E-T puede inhibir la traducción al competir con eIF4G para la unión a eIF4E y evitar la formación del complejo multimérico. El factor eIF4E-T podría estar involucrado en las primeras etapas de transición de un RNAm destinado a la traducción o uno destinado a la degradación en Cuerpos P (Andrei et al., 2005).

En la mayoría de los organismos eucariontes la inactivación de la vía mTOR activa 4E-BP, lo que lleva a una baja en la regulación general de la síntesis de proteínas (Cargnello et al., 2012). Este hallazgo sugiere que la inhibición de la traducción y la localización de eIF4E en Cuerpos P están relacionados, la inhibición de la traducción resulta de la interrupción del

complejo de iniciación de la traducción que precede a la formación de los Cuerpos P (Ferraiuolo et al., 2005).

3.5.4 Participación en procesos oncogénicos

El gen *eIF4E* es un potente oncogen, el incremento en su expresión está asociado con la recurrencia y mortalidad del cáncer (Heikkinen et al., 2013). Su sobreexpresión se ha demostrado en diversos tipos de cáncer, como el de mama, cabeza y cuello, colon, próstata, vejiga, cuello uterino y de pulmón y se ha relacionado con la progresión de la enfermedad (De Benedetti & Graff, 2004) (Figura 11).

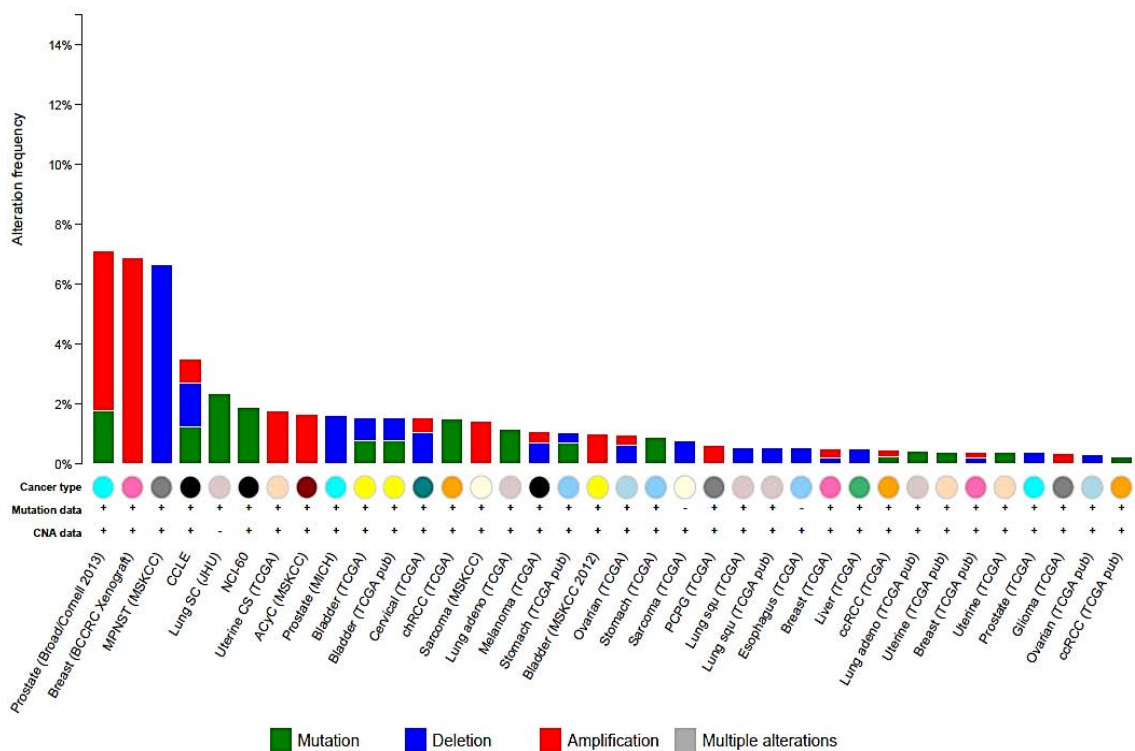


Figura 11. Resumen de alteraciones en el cáncer para el gen *eIF4E*. El panel muestra el análisis de datos genómicos del cáncer a gran escala para el gen *eIF4E*, los estudios muestran que este gen se encuentra alterado en diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de mama (Gao et al., 2013).

Estudios realizados reflejan, que incluso una elevación sutil de los niveles de expresión de *eIF4E* por encima del rango normal pueden tener un fuerte impacto en la traducción de los RNAm oncogénicos (Figura 12). La sobreexpresión constitutiva y la hiperactivación de *eIF4E* en los tumores, se podrían deber principalmente a mutaciones de otros genes de señalización, debido a las múltiples vías oncogénicas que convergen para *eIF4E*, no

obstante el papel de *eIF4E* en la iniciación del cáncer sigue siendo imprecisa (Bitterman & Polunovsky, 2014) .

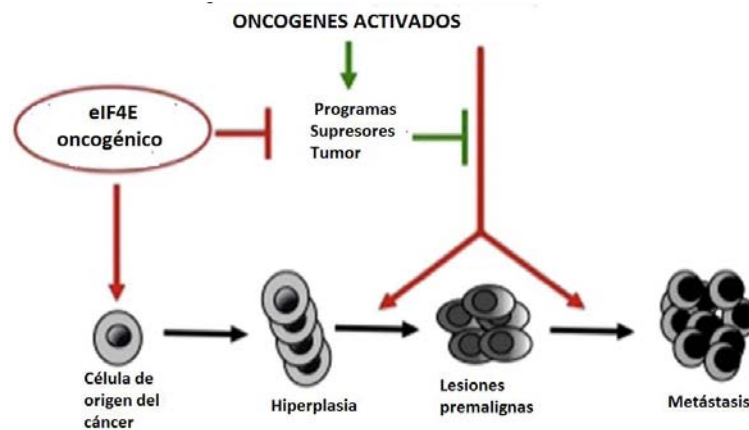


Figura 12. Modelo de la sobreexpresión de *eIF4E* en el proceso de carcinogénesis. La sobreexpresión de *eIF4E* podría inhibir los programas supresores de tumor como Rb y p53, acelerando la progresión del ciclo celular y por tanto la proliferación de células cancerosas hasta el desarrollo de metástasis (Modificada de Bitterman & Polunovsky, 2014).

Los niveles elevados de fosforilación de 4E-BPs están asociados con una mayor incidencia de recurrencia en cáncer de mama (Hsieh & Ruggero, 2010). Las proteínas 4E-BPs, median los efectos de señalización de mTOR en la traducción de los RNAm que codifican proteínas asociadas con la progresión del cáncer, invasión y metástasis (Alain et al., 2012). El factor mTOR se expresa en altos niveles en el cáncer, por lo que se ha buscado inhibir su actividad, lo cual constituye una diana terapéutica atractiva en muchos tumores (vía PI3K/AKT/ mTOR). En este sentido, la expresión de *eIF4E* podría servir de biomarcador predictivo de respuesta a inhibidores de la vía mTOR para pacientes de cáncer (Moschetta et al., 2014).

Otros estudios, demuestran que los miRNAs interfieren con la etapa de iniciación de la traducción y utilizan a *eIF4E* como blanco molecular (Humphreys et al., 2005). Algunos de los miRNAs que interactúan con *eIF4E* son miR-16, miR-124, miR-1, miR-5, miR-769, miR-141, miR-145, miR-505, miR-142, miR-497, miR-106b, los cuales se han encontrado sobreexpresados en diversos procesos oncogénicos, por lo que se denominan oncomiRs (Vlachos et al., 2015).

Los niveles elevados *eIF4E* podrían servir como un biomarcador que predice progresión de la enfermedad, la supervivencia global, o una recaída después de la terapia definitiva (Hsieh & Ruggero, 2010).

El único fármaco que ha demostrado la presencia de una actividad antitumoral ligada a la inhibición de *eIF4E* en pacientes con leucemia mieloide aguda, es el fármaco antiviral ribavirina, que actúa suprimiendo la proliferación celular. La ribavirina se ha demostrado que inhibe la unión de *eIF4E* a la 5'cap del RNAm y tiene actividad antitumoral en las células tumorales con niveles elevados de *eIF4E*. En un estudio clínico la ribavirina provocó mejoras clínicas en los pacientes con mal pronóstico, con sobreexpresión de *eIF4E*. La respuesta clínica se correlacionó con la inhibición de *eIF4E*, y la reducción de los niveles de proteínas (Assouline et al., 2009).

En los últimos años, se han empleado diversas estrategias para inhibir *eIF4E*, incluyendo el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO) dirigidos contra *eIF4E*, antivirales análogos de guanosina, inhibidores de moléculas pequeñas y fitoquímicos naturales tales como curcumina y silibinina, sin embargo tampoco hay estudios concluyentes acerca de este tipo de terapias (Ramalingam et al., 2014).

En diferentes trabajos, el objetivo terapéutico principal que se propone es la normalización de *eIF4E* y no suprimir su función lo que prometería ser una terapia potencialmente bien tolerada (Bitterman & Polunovsky, 2014).

3.5.5 Importancia en el cáncer de mama

El oncogen *eIF4E* se sobreexpresa frecuentemente en cánceres de mama primarios y metastásicos. Se ha encontrado que su sobreexpresión, incluye al menos 50% de los cánceres de mama (Pettersson et al., 2015).

En el cáncer de mama la sobreexpresión de *eIF4E* se correlaciona con la desregulación de los genes que participan en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular tales como ciclina D1, factores de angiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos FGF, así como la disminución de la actividad de MMP-3 y MMP-9 (Wheater et al., 2010). Por lo que, niveles elevados de *eIF4E* son críticos para el desarrollo de angiogénesis y la progresión de los carcinomas de

mama. Así mismo la sobreexpresión en el cáncer de mama de *eIF4E*, constituye un marcador de mal pronóstico en los estudios retrospectivos y prospectivos, lo que está asociado a una mayor tasa de recaída (Soni et al., 2008).

En pacientes con CMTN los altos niveles de *eIF4E* se asocian a una mayor tasa de recurrencia (Hsieh & Ruggero, 2010). Algunos estudios demuestran que, una disminución en la expresión del gen podría suprimir el crecimiento celular y la migración (Zhou *et al.*, 2011).

Los principales estudios terapéuticos para el cáncer de mama, se han enfocado al uso de fármacos como la rapamicina (sirolimus) para inhibir la vía mTOR (Hu et al., 2014), así como el uso de la ribavirina, para inhibir directamente a *eIF4E*, empleando diversos modelos (Pettersson et al., 2011). El potencial oncogénico de *eIF4E* es estrictamente dependiente de la fosforilación por Mnk en la serina 209, por lo que una de las opciones terapéuticas actualmente desarrolladas, propone bloquear la función de Mnk y por tanto la fosforilación de *eIF4E* en el cáncer de mama, en particular para el cáncer de mama HER2 positivo y triple negativo que no tienen tratamiento eficaces. Un ensayo realizado a nivel *in vitro*, muestra que la degradación de Mnk1 por agentes bloqueadores del metabolismo del ácido retinoico, bloquean la fosforilación de *eIF4E* y posteriormente, inhiben el crecimiento celular, la colonización, invasión, y la migración e inducen la apoptosis. Lo que proporciona evidencia para el estudio de un tratamiento terapéutico para el cáncer de mama, basado en la degradación de Mnk/eIF4E (Ramalingam et al., 2014).

En conjunto, estos datos sugieren que *eIF4E* podría ser un objetivo terapéutico prometedor para el cáncer de mama, así como para una amplia gama de otros tipos de cáncer (H. Yang et al., 2012). La terapia contra *eIF4E*, sería eficaz en una variedad de subtipos de cáncer de mama incluyendo el triple negativo para el que actualmente no hay terapias dirigidas (Soni et al., 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama a nivel mundial y en México, constituye la neoplasia con las mayores tasas de incidencia y mortalidad, las cuales han ido en aumento en los últimos años, especialmente (GLOBOCAN IARC, 2012). Los estudios clínicos y epidemiológicos enfocados a la disminución de estos índices, muestran que, limitaciones en la atención ofrecida por parte de los sistemas de salud es uno de los mayores obstáculos a los que se enfrenta la población, además de que las opciones terapéuticas más empleadas presentan altos niveles de citotoxicidad, lo que se traduce en una recurrencia del cáncer (Porter, 2009).

El estudio de las diferentes características moleculares del cáncer de mama, ha permitido el desarrollo de modelos propuestos como una opción de terapia dirigida a diferentes blancos moleculares (Munagala et al., 2011). Actualmente, uno de los principales blancos moleculares que se encuentra en estudio, es el gen *eIF4E* que participa en la proliferación celular normal, sin embargo, induce la tumorigénesis cuando se sobreexpresa (Avdulov et al., 2015) confiriendo a las células las características fisiopatológicas para el desarrollo del cáncer de mama (Hanahan & Weinberg, 2011). Sin embargo, los mecanismos por los que *eIF4E* participa en el cáncer de mama aún no están del todo descritos (Avdulov et al., 2015). El gen *eIF4E* se ha asociado a la recurrencia y una disminución en la supervivencia en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Flowers et al., 2009), por lo que diversos estudios proponen que *eIF4E* sería un buen marcador de pronóstico y de respuesta al tratamiento incluso en el cáncer de mama triple negativo (Ramalingam et al., 2014; Zhou et al., 2011).

Por ello, este trabajo se centra en la clonación de la región codificante del gen *eIF4E*, a fin de contar con herramientas moleculares, que permitan caracterizar su participación en procesos oncogénicos en trabajos posteriores. Particularmente se emplearon dos modelos de cáncer de mama, uno positivo para el receptor de estrógenos (MCF-7) y el otro con fenotipo triple negativo (MDA-MB-231). Este último es un subtipo del cáncer de mama que se caracteriza por presentar una mayor agresividad y un pronóstico pobre y los estudios muestran que aún no existen terapias eficaces contra él (de Ruijter et al., 2011).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Clonar el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E* a partir de líneas celulares humanas de cáncer de mama, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en un vector de expresión.

5.2 Objetivos Particulares

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar la región codificante del gen *eIF4E* y de *GAPDH*, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
2. Extraer RNA a partir de las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
3. Amplificar el transcrito maduro para el gen *eIF4E* por medio de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Clonar la región codificante para *eIF4E* en el vector de expresión pcDNA 3.1/ V5-His TOPO.
5. Transformar células competentes DH5 α de *E.coli*, con el plásmido recombinante.
6. Tamizar las clonas que presenten el plásmido recombinante pcDNA-*eIF4E*.
7. Caracterizar las clonas seleccionadas para *eIF4E* por secuenciación tipo Sanger.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama General de Trabajo

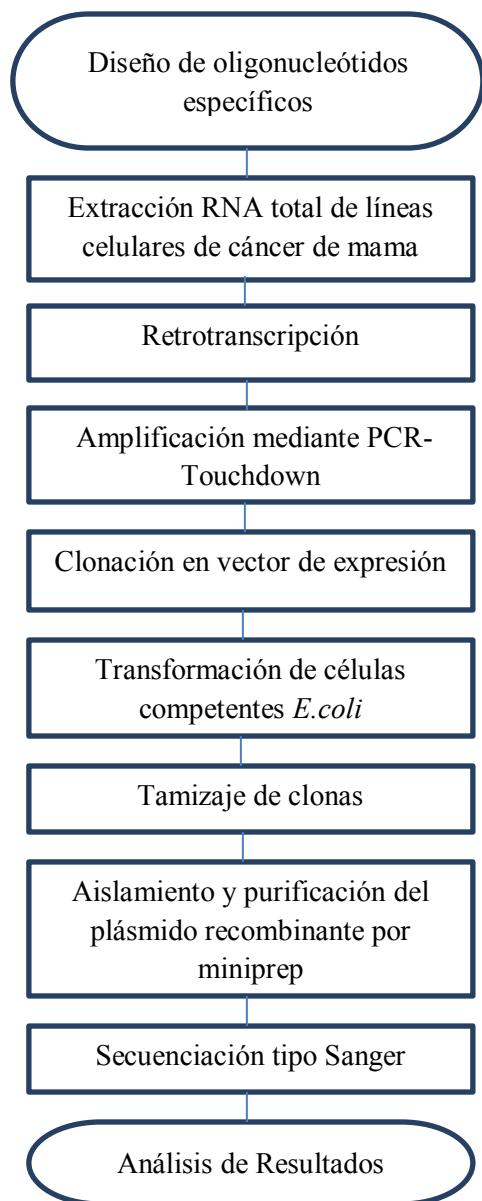


Figura 13. Clonación de la región codificante de *eIF4E*. Se esquematizan los pasos realizados para llevar a cabo la clonación del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, a partir de un diseño específico de oligonucleótidos y la extracción de RNA total de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, que se empleó para llevar a cabo la síntesis de cDNA con la posterior amplificación mediante PCR-TD, ligando los productos obtenidos en un vector de expresión y transformando células químicamente competentes con el plásmido recombinante, tamizando las clonas por PCR de colonia y aislando los plásmidos recombinantes mediante miniprep para analizar sus secuencias, mediante secuenciación tipo Sanger.

6.2 RT-PCR

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para la amplificación de la región codificante del gen *eIF4E* y *GAPDH* se diseñaron basados en sus secuencias de referencia CDS. Dichas secuencias fueron obtenidas en formato FASTA de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el ID: NM_001968.3 para *eIF4E* y NM_002046.5 para *GAPDH*. Para el diseño de los oligonucleótidos, se empleó el software Primer 3 (Department of Computational Medicine and Bioinformatics - University of Michigan Medical School) y se realizó un análisis *in silico* con el software Primer Blast (NCBI), para corroborar que los productos fueran específicos para la secuencia de interés. Además se utilizó el programa OligoCalc (Northwestern University) para analizar la formación de horquillas y la complementariedad en cada oligonucleótido.

Para la construcción de la proteína de fusión, se añadió una secuencia Kozak y la secuencia del epítipo artificial de HA (hemaglutinina) del virus de influenza, en el extremo 5'-terminal del oligonucleótido *forward* (sentido) para la región codificante de *eIF4E*, realizando un alineamiento de los oligonucleótidos sentido y antisentido para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E* y *GAPDH* con el software PriDimer Check para evaluar la compatibilidad.

6.2.2 Extracción de RNA

Se aisló el RNA total a partir de las líneas celulares MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (CMTN) (Ver Anexo 1) empleando el método de TRIzol (Life Technologies). Las células se crecieron en un frasco T25, al presentar un 90-95% de confluencia se les removió cuidadosamente el medio y se adicionó 1 mL de TRIzol (Life Technologies), se llevó a cabo la extracción de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se cuantificó en el espectrofotómetro Epoch, almacenando la preparación a -80°C .

6.2.3 Síntesis de cDNA

A partir del RNA total de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se realizó la síntesis de cDNA por medio de una transcripción reversa (retrotranscripción). Las condiciones de reacción se indican enseguida (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de la reacción de la síntesis de cDNA

Reactivos	Volumen
5X Reaction Mix (Invitrogen)	4 μ L
10X SuperScript Enzyme Mix (Invitrogen)	2 μ L
RNA Total (100 pg a 1 μg)	500 ng
Agua tratada con DEPC	csp 20 μ L

Para realizar la síntesis de cDNA se siguió el siguiente programa (Tabla 5):

Tabla 5. Programa para la retrotranscripción

	Transcripción reversa		Enfriamiento
Temperatura	37°C	95°C	4°C
Tiempo	60 min	5 minutos	5 min (hasta su uso)

El cDNA se almacenó a -20 ° C.

6.2.4 Amplificación de la secuencia codificante de *eIF4E*

La amplificación del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, se realizó mediante una variante de la reacción en cadena de la polimerasa PCR-Touchdown (TD), empleando los oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante de *eIF4E* y oligonucleótidos para el transcrito maduro que codifica para el gen de Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa (*GAPDH*) como control positivo, además de una reacción sin cDNA utilizada como control negativo. Los componentes de la reacción se indican a continuación (Tabla 6).

Tabla 6. Componentes de la reacción de amplificación de la secuencia codificante de *eIF4E*

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
10X KAPA Taq Buffer (1.5 mM Mg)	2.5 μ L	1X
10 mM dNTP Mix	0.5 μ L	0.2 mM
KAPA Taq DNA polimerasa (5U/ μL)	0.1 μ L	1 U
*Primer F (10 μM)	0.4 μ L	0.2 μM
*Primer R (10 μM)	0.4 μ L	0.2 μM
**cDNA (10 pg – 1 μg)	1 μ L	10 pg – 1 μg
Agua libre de nucleasas	20.1 μ L	csp 25 μL

*Oligonucleótidos para *eIF4E* o *GAPDH* ** cDNA MCF-7 o MDA-MB-231

El programa empleado para la PCR -Touchdown fue el siguiente (Figura 14):

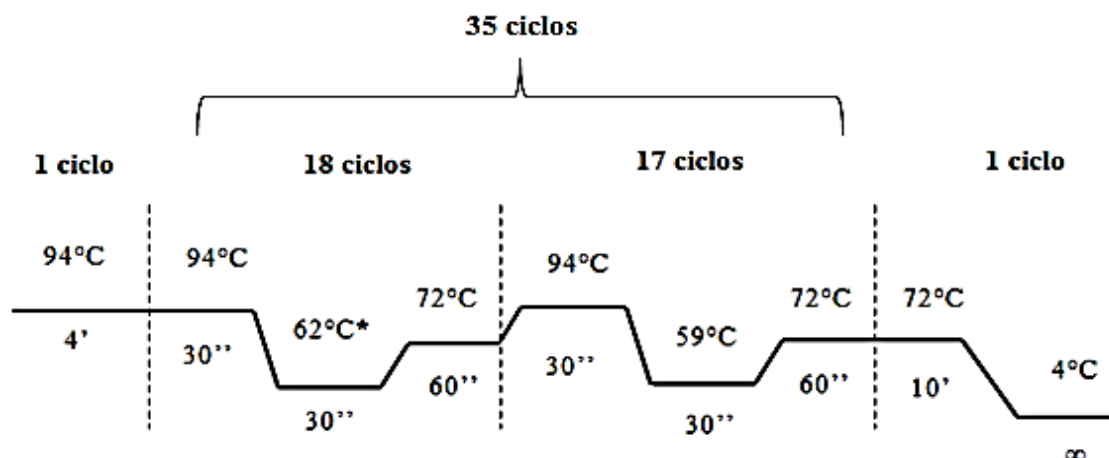


Figura 14. Programa empleado para la PCR-TD. Se muestran los pasos principales de la reacción de PCR, desnaturalización, alineamiento y elongación. *La temperatura de alineamiento se disminuyó 0.5°C cada 3 ciclos (Touchdown).

6.2.5 Purificación de los productos de amplificación

Para purificar los productos de amplificación del transcrito maduro para el gen *eIF4E*, se utilizó el kit FastGene[®] Gel/PCR Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados de *eIF4E* se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y se almacenaron a 4°C para su posterior ligación en el vector de expresión pcDNA[™]3.1/V5-His TOPO[®] TA (Ver Anexo 2).

6.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 2% para la visualización del RNA y al 1% para los productos amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la purificación de los mismos. Para ello se realizó la mezcla de agarosa y buffer TAE 1X disolviendo por calor y añadiendo la cantidad necesaria de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) para una concentración final de 0.5 µg/mL, se dejó polimerizar y se colocó en la cámara de electroforesis y añadiendo buffer TAE 1X. Para la carga de las muestras, se colocaron tantas gotas de buffer de carga 6X (KAPA Loading Dye), como número de muestras, colocando solo en el primer pozo el marcador de peso molecular de 10000 pb (KAPA Universal DNA Ladder), se realizó la corrida (80-100V) y se visualizó el gel en el

transiluminador de luz UV, se obtuvieron fotos a partir del fotodocumentador con el software Image Lab Life Science - Bio-Rad®.

6.3 Clonación en vector de expresión

Para realizar la ligación de los productos de amplificación de la región codificante del gen *eIF4E*, se empleó el kit pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit (Ver Anexo 2). Las condiciones para la reacción de clonación fueron las siguientes (Tabla 7):

Tabla 7. Condiciones para la reacción de clonación

Reactivo	
Producto fresco de PCR de la región codificante de <i>eIF4E</i>	0.5 a 4 µL
Solución Salina	1 µL
Agua estéril	lo necesario para un volumen final 5 µL
TOPO vector	0.3 µL

Se incubó la reacción a temperatura ambiente (22-23 ° C) y se procedió a la transformación de células químicamente competentes.

6.4 Transformación de células químicamente competentes

Para realizar la transformación de células químicamente competentes, se añadieron 2 µL de cada ligación en 25 µL de células químicamente competentes de *E.coli* DH5α (Ver Anexo 1). Se incubaron los tubos en hielo por 25 minutos, se realizó un choque térmico de las células por 40s a 42°C y se transfirieron los tubos a hielo. Se añadieron 250 µL de medio SOC y se incubaron horizontalmente a 37°C con agitación (200 rpm) por una hora. Se añadieron dos diferentes volúmenes, 50 µL y 150 µL de cada transformación, en cajas Petri con medio LB (Luria-Bertani) y ampicilina (50 µg/ml), incubando toda la noche a 37°C.

6.5 Tamizaje de las clonas

Una vez obtenidas las colonias de la placa de transformación se emplearon directamente como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para ello, se tomaron cada una de las colonias y se inocularon en microtubos de 0.2 mL, los cuales contenían 10 µL de agua libre de nucleasas.

Enseguida a cada uno de los tubos se le añadieron los siguientes componentes (Tabla 8):

Tabla 8. Condiciones de reacción para la PCR de colonia

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
10X KAPA Taq Buffer (1.5 mM Mg)	2.6 µL	1X
10 mM dNTP Mix	0.5 µL	0.2 mM
KAPA Taq DNA polimerasa (5U/ µL)	0.1 µL	1 U
Primer 1 (10 µM)	0.4 µL	0.2 µM
Primer 2 (10 µM)	0.4 µL	0.2 µM
Agua libre de nucleasas	10.1 µL	

* T7 (F) ó BGH (R) **BGH(R) ó eIF4E(R)

El programa empleado para la PCR de Colonia fue el de PCR-Touchdown descrito anteriormente (Figura 14).

6.6 Aislamiento y purificación del plásmido

Para el aislamiento y purificación del plásmido recombinante, se empleó el método de miniprep, utilizando el kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Se seleccionaron las colonias del medio sólido LB con ampicilina y se inocularon cada una en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/ml), incubando por 12-16 horas a 37°C con agitación (200-250 rpm). Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se almaceno el plásmido de DNA purificado a -80°C.

6.7 Secuenciación tipo Sanger y análisis bioinformático

Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar en una concentración de 200 ng/µL, al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología UNAM, en donde se llevó a cabo una secuenciación de tipo Sanger con los oligonucleótidos T7 (sentido) y BGH (antisentido), en el secuenciador Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer (24 capilares). Para el alineamiento de las secuencias se emplearon los programas DNA Baser Sequence Assembler (Heracle BioSoft S.R.L) y MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2013), corroborando los alineamientos con el programa BLAST (NCBI) a nivel nucleotídico (blastn) y a nivel proteico (blastx) y ExpASy (SIB Bioinformatics Resource Portal), para un análisis más detallado a nivel proteico.

7. RESULTADOS

7.1 Diseño de oligonucleótidos y análisis bioinformático

El diseño de oligonucleótidos específicos dirigidos contra la región codificante del gen *eIF4E* y de *GAPDH* se realizó con el algoritmo informático Primer 3, a partir de las secuencias genómicas de estos genes obtenidas de la base de datos del NCBI. Los oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta que la temperatura de alineamiento fuera similar para cada oligonucleótido y cercana a 60°C para conferir una mayor estabilidad (Tabla 9). Para conocer la especificidad de los oligonucleótidos, se empleó el software Primer Blast de NCBI, el cual emplea el algoritmo BLAST junto con el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch (NW) para buscar la especificidad entre los oligonucleótidos y la secuencia de interés (Ye et al., 2012), por lo que Primer Blast se desempeña como una PCR *in silico*. Con este análisis se obtuvo un producto de 651 pb que es específico para la región codificante del gen *eIF4E* (*Homo sapiens*) (Figura 15) y un producto específico de 185 pb para la región codificante de *GAPDH* (*Homo sapiens*) (Figura 16).

En la tabla 9 se resumen las características de los oligonucleótidos obtenidos y se muestran los resultados de los alineamientos entre los oligonucleótidos y la secuencia de interés.

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para la región codificante de *eIF4E* y *GAPDH*.

Gen	Sentido 5'-3'	Tm	Antisentido 5'-3'	Tm	Producto
<i>eIF4E</i>	ATGGCGACTGTCGAACCG	60.13	AACAACAAACCTATTTTTAGTGGTGGA	59.88	651 pb
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	59.97	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	59.99	185 pb

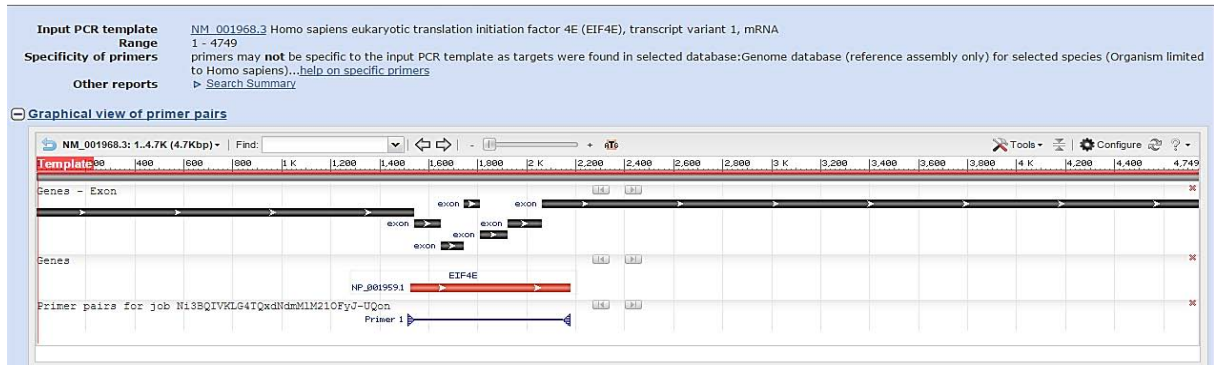


Figura 15. Análisis de especificidad de los oligonucleótidos para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*. Se esquematiza el resultado obtenido en Primer Blast de la especificidad de los oligonucleótidos de *eIF4E* y su alineamiento limitado al organismo *Homo sapiens*. Se observa que los oligonucleótidos presentan un alineamiento específico con la secuencia de interés.

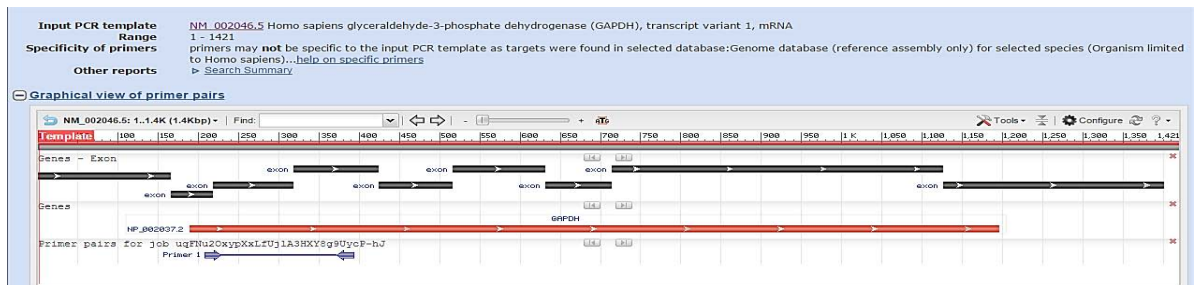


Figura 16. Análisis de especificidad de los oligonucleótidos para la región codificante del gen *GAPDH*. Se muestra el resultado obtenido en Primer Blast de la especificidad de los oligonucleótidos de *GAPDH* y su alineamiento limitado al organismo *Homo sapiens*. Se observa que los oligonucleótidos presentan un alineamiento específico con la secuencia de interés.

Además del uso de estas herramientas bioinformáticas, se empleó OligoCalc, un software que proporciona los resultados del cálculo de la temperatura de fusión y además permite analizar la formación de homodímeros y de estructuras asa-tallo a nivel intramolecular (Kibbe, 2007). El análisis para el par de oligonucleótidos diseñados para la región codificante de *eIF4E* muestra que no se presenta la formación de bucles ni autoalineamiento para los oligonucleótidos eIF4E-F y eIF4E-R (Figuras 17 y 18). Tampoco los oligonucleótidos GAPDH-F y GAPDH-R diseñados para la región codificante de *GAPDH* presentaron características de formación de bucles y/o autoalineamiento (Figuras 19 y 20).

eIF4E-F: ATGGCGACTGTCGAACCG

Formación de Bucles: No
Complementariedad 3': No
Autoalineamiento: No

Figura 17. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido eIF4E-F. Se esquematizan los resultados obtenidos de OligoCalc para el oligo eIF4E-F, se puede observar que no existe auto complementariedad ni formación de estructuras asa-tallo.

eIF4E-R: AACAACAAACCTATTTTTAGTGGTGA

Formación de Bucles: No
Complementariedad 3': No
Autoalineamiento: No

Figura 18. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido eIF4E-R. Se esquematizan los resultados obtenidos de OligoCalc para el oligo eIF4E-R, se encuentra que no existe auto complementariedad ni formación de estructuras asa-tallo.

GAPDH-F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT

Formación de Bucles: No
Complementariedad 3': No
Autoalineamiento: No

Figura 19. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido GAPDH-F. Se esquematizan los resultados obtenidos de OligoCalc para el oligo GAPDH-F, se observa que no existe auto complementariedad ni formación de estructuras asa-tallo.

GAPDH-R: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

Formación de Bucles: No
Complementariedad 3': No
Autoalineamiento: No

Figura 20. Resultados de OligoCalc para el oligonucleótido GAPDH-R. Se esquematizan los resultados obtenidos de OligoCalc para el oligo GAPDH-R, se aprecia que no existe auto complementariedad ni formación de estructuras asa-tallo.

En conjunto, con estos análisis *in silico* se determinó que los oligonucleótidos presentan la especificidad y las características adecuadas para la amplificación de la región codificante del gen *eIF4E*, por lo que, una vez confirmadas dichas características, se realizaron adiciones en el extremo 5'-terminal del oligonucleótido *forward* (sentido) para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*. Para ello, se añadió una secuencia Kozak, la cual

permite una eficiente traducción, ya que dicha secuencia presenta una purina en la posición -3 (antes del codón de inicio) para la iniciación eficaz de la traducción y una G en la posición +4, lo que permite aumentar aún más la eficiencia de la traducción (Kozak, 1978; Kozak, 2002). Así mismo, se añadió la secuencia del epítipo artificial de HA (hemaglutinina), lo que permite generar un marcaje específico, para facilitar su posterior detección y purificación a nivel de proteína (Figura 21).

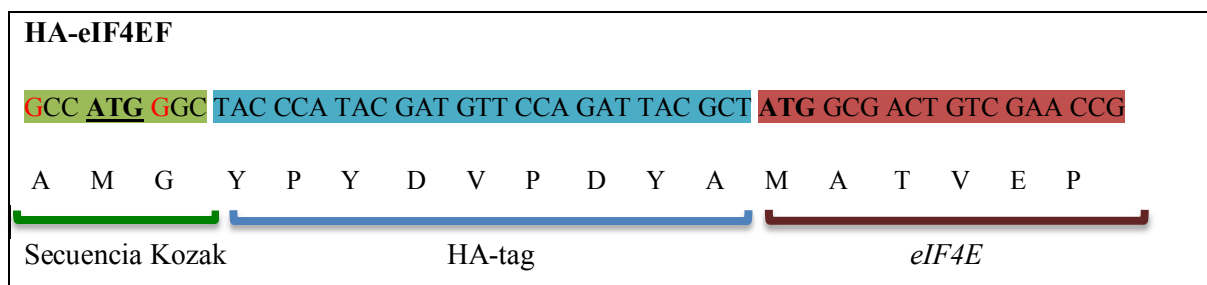


Figura 21. Oligonucleótido de eIF4E sentido modificado. A partir de la secuencia específica del oligo eIF4E sentido (rojo), se añadió una secuencia consenso Kozak (verde) y la secuencia del epítipo artificial HA (hemaglutinina) (azul).

Para comprobar la no inter-complementariedad e incompatibilidad de los oligonucleótidos HA-eIF4EF, eIF4ER, GAPDHF y GAPDHR, se utilizó el software PriDimer Check, que calcula la estabilidad de la complementariedad de los pares de oligonucleótidos empleando parámetros termodinámicos, usando un valor de corte estricto de -7 kcal/mol para definir la formación de un dímero (Shen et al., 2010).

Los resultados del análisis para el par de oligonucleótidos de *eIF4E*, presentan un valor ΔG° (37°C) = 0 kcal/mol (Figura 23), al igual que para el par de oligonucleótidos de *GAPDH* (Figura 23).

Sequence information	Possible Primer Dimer	$\Delta G(37^\circ\text{C})$
FP:Forward p vs RP:Reverse p Matches = 0 alignment score= -1	5' GCCATGGGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCGACTGTCGAACCG 3' 3' AGGTGGTGATTTTTATCCAACAACAA 5'	0kcal/mol

Figura 22. Análisis de inter-complementariedad para los oligonucleótidos del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*. El análisis de inter-complementariedad con PriDimer Check para los oligonucleótidos de *eIF4E* muestra un valor de correspondencia igual a 0 y un valor ΔG° (37°C)= 0 kcal/mol, lo que indica que no existe complementariedad entre los oligonucleótidos.

Sequence information	Possible Primer Dimer	$\Delta G(37^\circ\text{C})$
FP:Forward vs RP:Reverse Matches = 0 alignment score= -1	5' GAGTCAACGGATTGGTCG 3' . 3' GACTCTGCCCTTCGAACAG 5'	0kcal/mol

Figura 23. Análisis de inter-complementariedad para los oligonucleótidos de *GAPDH*. El análisis con PriDimer Check para los oligonucleótidos de *GAPDH* presenta un valor de correspondencia igual a 0 y un valor $\Delta G^\circ (37^\circ\text{C}) = 0$ kcal/mol, lo que indica que no existe complementariedad entre los oligonucleótidos.

7.2 Extracción de RNA

El aislamiento de RNA total a partir de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (CMTN) (Ver Anexo 1) se llevo a cabo empleando el método de TRIzol (Life Technologies). El TRIzol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, este último es un agente caotrópico por lo que es un potente desnaturizante de proteínas con capacidad de inhibir RNAsas, el fenol permite la solubilización del material biológico y la adición de cloroformo la separación de fases, donde las proteínas permanecen en la fase orgánica, el DNA en la interfase y el RNA permanece en la fase acuosa. Por lo tanto, el TRIzol confiere grandes ventajas al permitir la extracción y purificación de RNA, DNA y proteínas a partir de una sola muestra (Rio et al., 2010).

El RNA para cada una de las líneas celulares de cáncer de mama se visualizó en un gel de agarosa al 2%, observando dos bandas correspondientes al RNA ribosomal (RNAr) 28s y 18s, lo que corrobora la integridad y calidad del RNA aislado, además se aprecia una banda débil de alto peso molecular correspondiente a DNA genómico (Figura 24).

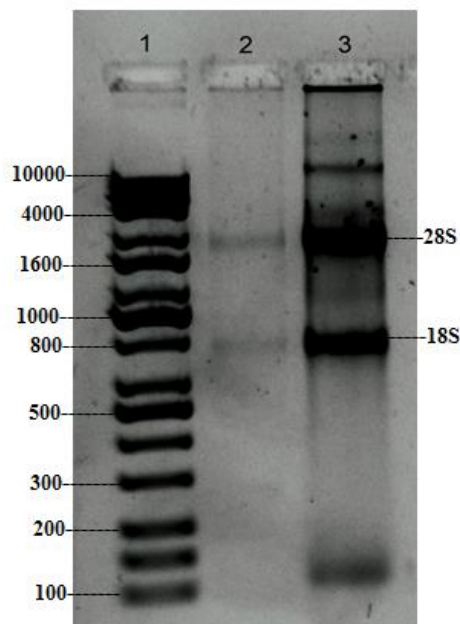


Figura 24. Extracción de RNA a partir de líneas celulares. Gel de agarosa al 2%. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1Kb, en el carril 2 y 3 se aprecian 2 bandas correspondientes al RNAr 28S y 18S para las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (carril 2) y MDA-MB-231 (carril 3); se puede apreciar una banda de alto peso molecular correspondiente a DNA genómico.

7.3 Amplificación de la región codificante de *eIF4E*

Para realizar la amplificación de la región codificante de *eIF4E* se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR-TD (Touchdown) (62°C-59°C), la cual permite el aumento de la especificidad, sensibilidad y rendimiento del producto esperado, ya que utiliza una temperatura inicial de alineamiento por encima de la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos empleados, después, se presentan transiciones progresivas de la temperatura de alineamiento a una temperatura más baja en el curso de los ciclos sucesivos. Cualquier diferencia de T_m entre un alineamiento correcto e incorrecto producirá una ventaja exponencial del doble por ciclo (Korbie & Mattick, 2008).

Para realizar la amplificación se emplearon los oligonucleótido específicos diseñados para *eIF4E*, utilizando como control positivo los oligonucleótidos diseñados para la región codificante del gen *GAPDH* y se visualizaron los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa al 1%, con el respectivo marcador de peso molecular de 1Kb. En el gel de agarosa se aprecia una sola banda para cada una de las líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF-7 y MDA-MB-231, indicativa de un producto único y específico para el transcrito

maduro que codifica para el gen de *eIF4E*, la banda presenta un tamaño de 651 pb, lo que corresponde al análisis realizado *in silico* del producto esperado. De la misma manera para la secuencia codificante de *GAPDH*, se presenta una sola banda de un tamaño de 185 pb, correspondiente al producto esperado, de acuerdo al análisis realizado *in silico* (Figura 25).

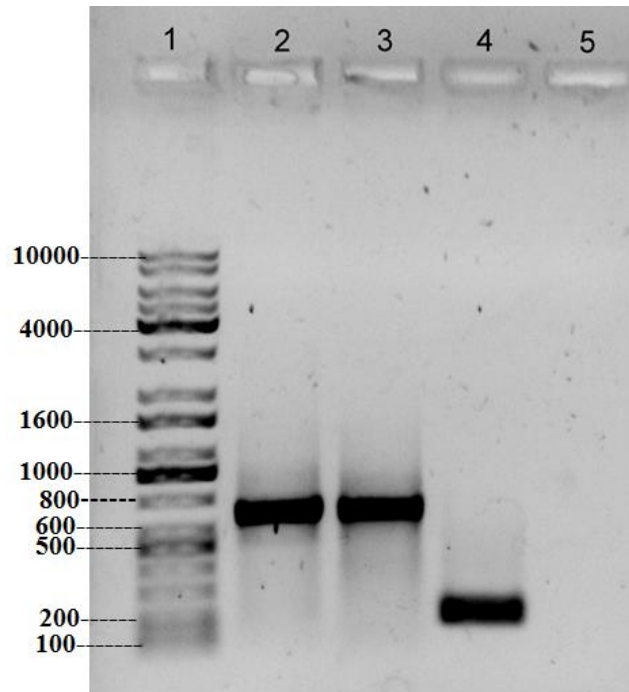


Figura 25. Productos de amplificación de la región codificante de *eIF4E*. Gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular de 1Kb, en los carriles 2 y 3 los amplificados para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E* a partir del cDNA de MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente; se puede observar una sola banda para cada uno de los amplificados de un tamaño de 651 pb, que es correspondiente y específico para el producto esperado. En el carril 4 se observa el control positivo empleando los oligonucleótidos específicos para la región codificante de *GAPDH*, se aprecia una sola banda de un tamaño de 185 pb, correspondiente al tamaño esperado y en el carril 5 se presenta el control negativo (blanco), en el cual no se observa ninguna banda de amplificación como corresponde.

Los productos de amplificación de *eIF4E*, fueron purificados mediante el kit FastGene[®] Gel/PCR Extraction y 30 ng de cada uno de los productos purificados se observaron en un gel de agarosa al 1%, apreciando una sola banda para cada uno de los productos, con el tamaño esperado de 651 pb (Figura 26).

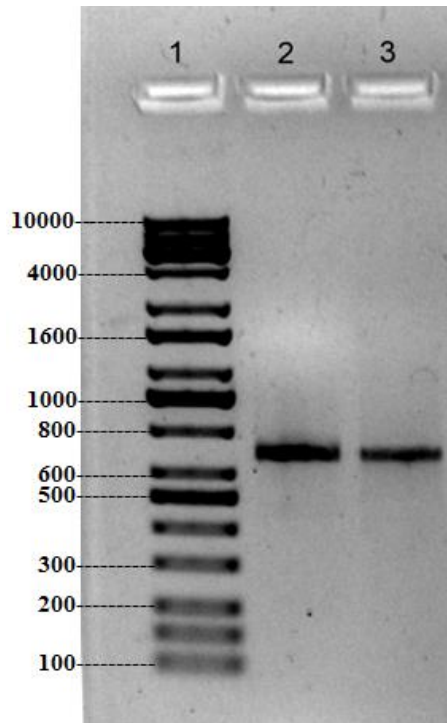


Figura 26. Purificación de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular de 1Kb, en el carril 2 y 3 los productos purificados de PCR para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E* en las líneas celulares de MCF-7 y MDA-MB-231(30 ng c/u), respectivamente. Para cada uno de los productos de PCR purificados se observa una sola banda con un tamaño de 651 pb.

7.4 Clonación y transformación de células competentes

Los productos purificados se ligaron en el vector de expresión pcDNA 3.1/ V5-His TOPO. La reacción de ligación en el vector es posible ya que la Taq polimerasa empleada en la reacción de PCR, tiene una actividad transferasa terminal al añadir una desoxiadenosina (A) en los extremos 3' de los productos de PCR, mientras que el vector presenta residuos de desoxitimidina (T) en la posición 3', lo que permite insertar los productos de PCR y ligarlos de manera eficiente con el vector. Por su parte, la topoisomerasa I de virus vaccinia unida covalentemente al vector, se une al DNA de doble cadena en sitios específicos y escinde el esqueleto fosfodiéster, después de la secuencia 5'-CCCTT en una de las hebras. La energía proveniente de la ruptura del enlace fosfodiéster, es conservada por la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la cadena escindida y un residuo tirosil (Tyr-274) de la topoisomerasa I. El enlace fosfo-tirosilo entre el DNA y la enzima, posteriormente puede ser atacado por el hidroxilo 5' de la hebra original escindida, revirtiendo la reacción y

liberando la topoisomerasa. Lo anterior permite que se ligue el producto de forma no direccional al plásmido (Ver anexo 2).

Posterior a la clonación se realizó la transformación, que se refiere a la introducción de material genético extraño en células procariotas (bacterias), el cual se incorpora en estas, esta reacción se realizó en células competentes de *E.coli* DH5 α (Ver anexo 1), empleando medio LB (Ver anexo 1) con el antibiótico ampicilina (50 μ g/mL ampicilina). Se empleó ampicilina ya que el vector de expresión pcDNA 3.1/ V5-His TOPO, presenta un gen de resistencia ampicilina, lo que permite seleccionar y analizar las clonas positivas que crecen en este medio.

El número de clonas obtenidas, a partir de la ligación de la región codificante del gen *eIF4E* con el vector de expresión, fueron 7 para la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7, mientras que las clonas obtenidas a partir de la línea celular humana de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron 3.

7.5 Tamizaje de clonas

Para realizar el tamizaje de las clonas e identificar las clonas que se encontraban en la orientación apropiada, se empleó la técnica de PCR de colonia, un método utilizado para tamizar rápidamente los plásmidos que contienen el inserto deseado directamente a partir de colonias bacterianas. La PCR de colonia se realizó empleando el oligonucleótido del promotor T7, que permite la transcripción *in vitro* en la orientación sentido y la secuenciación a través del inserto. También se utilizó el oligonucleótido BGH antisentido que también permite la secuenciación del inserto (Ver Anexo 2) y el oligonucleótido eIF4E-R, para discernir entre los productos que se encontraban en la orientación correcta de los que se encontraban en la orientación incorrecta (Figura 27).

Mediante este análisis se encontró que, de las 7 clonas obtenidas para la línea celular MCF-7, sólo dos se encontraron en la orientación apropiada mientras que, de las 3 clonas obtenidas para la línea celular MDA-MB-231, sólo se encontró una en la orientación correcta, dichas clonas en la orientación apropiada se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, donde se puede observar una banda en la parte superior que corresponde al DNA genómico bacteriano y otra banda en la parte posterior que corresponde al producto de amplificación del plásmido recombinante. Para la amplificación empleando los

oligonucleótidos T7 y BGH-R, se observan bandas de 931 pb correspondiente al tamaño esperado (*eIF4E* + el sitio de policlonación del plásmido) (carriles 2, 5 y 8), la amplificación empleando los oligonucleótidos T7 y *eIF4E*-R presentan bandas de 742 pb (carriles 3, 6 y 9) que corresponden al tamaño correcto, mientras que para la amplificación empleando los oligonucleótidos *eIF4E*-R y BGH-R no se presentó ninguna banda de amplificación como se esperaba (carriles 4, 7 y 10), corroborando así que las clonas se encontraban en la orientación apropiada (Figura 28).

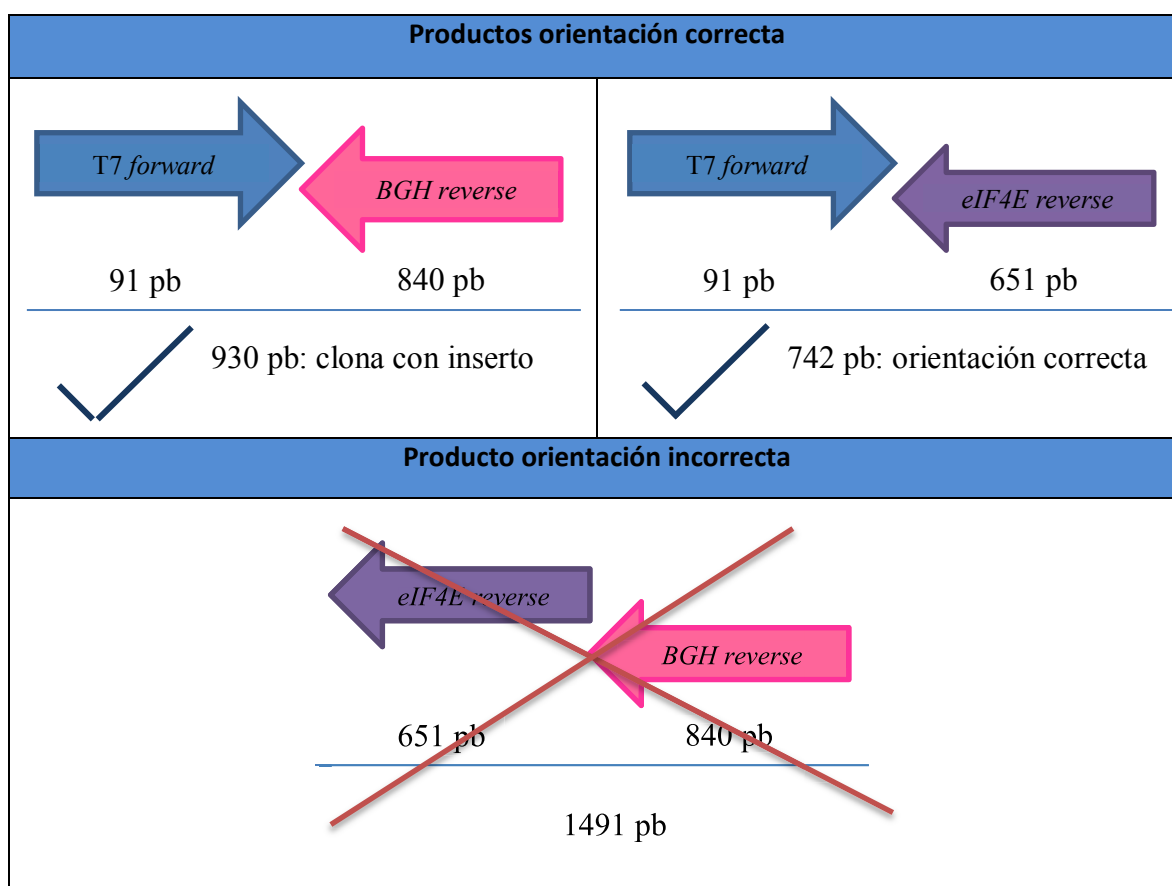


Figura 27. Productos de amplificación en orientación correcta e incorrecta para las clonas. Se esquematizan los productos esperados en la orientación correcta e incorrecta, para el tamizaje de las clonas con el plásmido recombinante, que contiene la secuencia de interés para la región codificante de *eIF4E*.

Después de realizar la amplificación, se utilizó la técnica de miniprep para purificar el plásmido recombinante, mediante esta técnica las células bacterianas se someten a una SDS lisis/alcalina, que permite la desnaturalización y precipitación selectiva del DNA plasmídico. El kit utiliza una exclusiva tecnología de membranas a base de sílice en una

columna de centrifugación, a la cual se une el DNA plasmídico permitiendo su purificación.

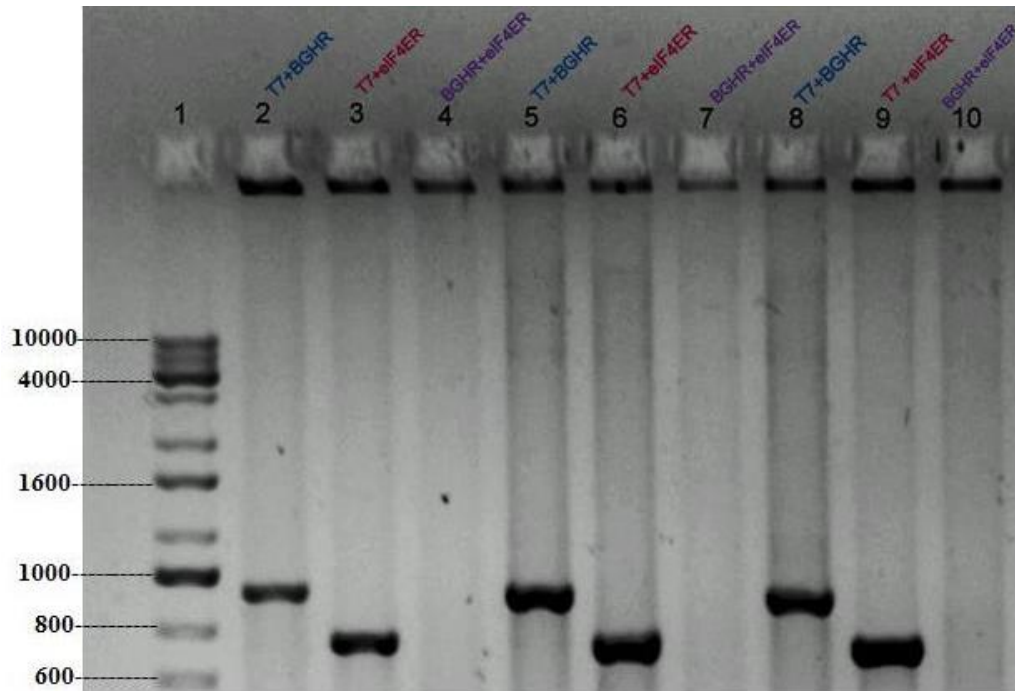


Figura 28. Tamizaje de clonas para el plásmido recombinante de *eIF4E*. En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular de 1kb. Los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a la amplificación de las clonas obtenidas para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E* a partir de la línea celular MCF-7, los carriles 8, 9 y 10 corresponden a la amplificación de la clona obtenida a partir de la línea celular MDA-MB-231. En todos los carriles se puede observar en la parte superior la presencia de una banda correspondiente a DNA genómico bacteriano. En los carriles 2, 5 y 8 se emplearon los oligonucleótidos T7 y BGH-R, se puede observar una banda de un tamaño de 931 pb en cada uno de los carriles, en los carriles 3, 6 y 9 se utilizaron los oligonucleótidos T7 y eIF4E-R observando una banda de 742 pb en cada uno de los carriles que corresponde al tamaño esperado y en los carriles 4, 7 y 10 los oligonucleótidos empleados fueron BGH-R y eIF4E-R, no se apreció ninguna banda en los carriles como se esperaba.

7.6 Secuenciación tipo Sanger de los plásmidos recombinantes

Para corroborar que las clonas seleccionadas se encontraran en la orientación apropiada y que no presentaran mutaciones ni cambios en el marco abierto de lectura, se secuenciaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología UNAM. Para ello se aisló y purificó el DNA plasmídico de las clonas transformadas, empleando el kit Thermo Scientific® GeneJET Plasmid. El método de secuenciación de Sanger o dideoxi se basa en el proceso de replicación, en este método se

utilizan dideoxinucleótidos (ddNTP), análogos estructurales de los desoxinucleótidos (dNTP), la DNA polimerasa utiliza como sustrato los ddNTP por su analogía con los dNTP y queda incorporado a la hebra en síntesis, pero la cadena no se puede elongar ya que los ddNTP carecen del grupo 3'-OH que impide la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido, así los ddNTP terminan la síntesis de DNA (Cabrera & Sánchez, 2001). Cada uno de los cuatro ddNTP se marca con un colorante fluorescente y los dNTP con otro colorante diferente, los productos de reacción son desnaturalizados y los fragmentos de DNA producidos se mezclan y se lleva a cabo una electroforesis en gel en tubos capilares, la fluorescencia se detecta mediante la incidencia de un haz láser que se lee en un escáner óptico, los resultados se muestran como un conjunto de picos en un gráfico denominado electroferograma (Pierce, 2009).

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó mediante los programas, MEGA6 y DNA Baser, los cuales emplean el algoritmo Clustal W y el programa MUSCLE para realizar los alineamientos. Además DNA Baser permite visualizar los electroferogramas de cada una de las secuencias. Así mismo, se realizó un alineamiento empleando el programa BLAST (blastn) del NCBI, contra el genoma humano para confirmar los alineamientos realizados anteriormente, ya que BLAST utiliza un algoritmo de alineamiento global que es más específico para la correspondencia de las secuencias obtenidas con la secuencia esperada.

Para la primera clona con la región codificante del gen *eIF4E*, a partir de la línea celular MCF-7, no se encontró ningún cambio a nivel nucleotídico, al realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia esperada empleando el programa MEGA6 (Figura 29) y BLAST (blastn), encontrando un porcentaje de identidad del 100% respecto a la secuencia de referencia (Figura 30).

El resultado de estos alineamientos, se apoyó en el análisis del electroferograma obtenido, el cual presentó una buena resolución, ya que se observan picos bien separados y con una altura adecuada, no obstante, se logra apreciar un poco de ruido de fondo. En dicho cromatograma se corroboró que, no se presenta ningún tipo de mutación en concordancia con los alineamientos obtenidos (Figura 31).

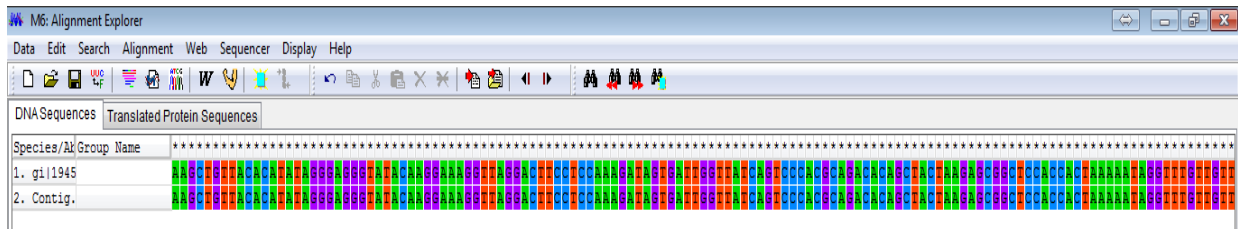


Figura 29. Análisis de la clona 1 con el programa MEGA6. Se muestra un fragmento representativo del alineamiento realizado entre la secuencia esperada (1), con las secuencias obtenidas para el plásmido recombinante con la región codificante de *eIF4E* (2). Dicho análisis muestra que no se presentan cambios en la secuencia nucleotídica obtenida.

Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), transcript variant 1, mRNA
 Sequence ID: ref|NM_001968.3|_Length: 4749 Number of Matches: 1

Range 1:	1524 to 2174	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1203 bits (651)		0.0	651/651 (100%)	0/651 (0%)	Plus/Plus	
Query	40	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	99			
Sbjct	1524	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	1583			
Query	100	AAAACGGAACTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	159			
Sbjct	1584	AAAACGGAACTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	1643			
Query	160	AACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAGCAAACCTGGCAAGCAAACCTG	219			
Sbjct	1644	AACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAGCAAACCTGGCAAGCAAACCTG	1703			
Query	220	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	279			
Sbjct	1704	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	1763			
Query	280	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCT	339			
Sbjct	1764	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCT	1823			
Query	340	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAACCGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	399			
Sbjct	1824	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAACCGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	1883			
Query	400	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATGGAGAA	459			
Sbjct	1884	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATGGAGAA	1943			
Query	460	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	519			
Sbjct	1944	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	2003			
Query	520	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	579			
Sbjct	2004	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	2063			
Query	580	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	639			
Sbjct	2064	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	2123			

```

Query 640 GCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCCTAAAAATAGGTTTGTTGTT 690
          |||
Sbjct 2124 GCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCCTAAAAATAGGTTTGTTGTT 2174

```

Figura 30. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 1. Se presenta el resultado del alineamiento global de las secuencias obtenidas para la clona 1, encontrando un porcentaje de identidad del 100% con la secuencia de interés perteneciente a la región codificante del gen *eIF4E*, lo que indica que dicha clona corresponde a la secuencia esperada y no presenta ninguna mutación.

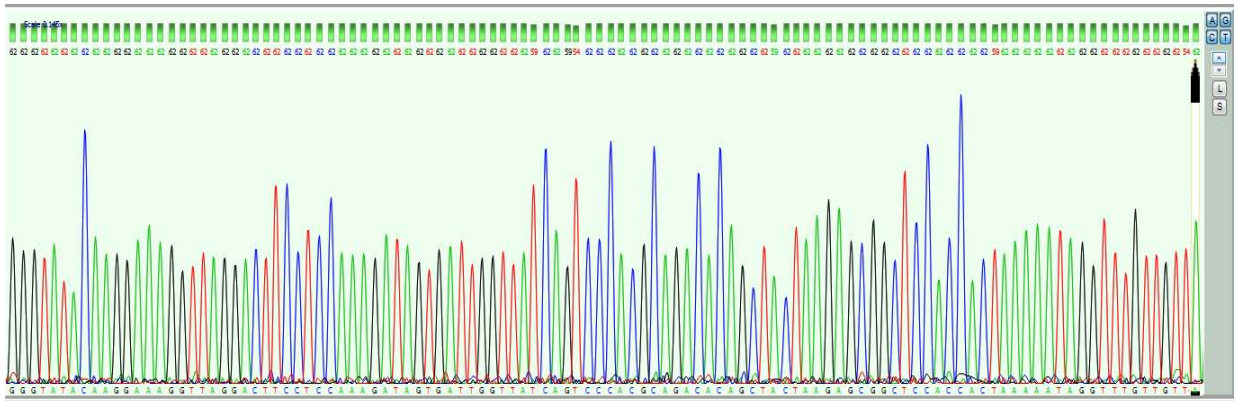


Figura 31. Electroferograma de la secuenciación para la clona 1. Se esquematiza el electroferograma para la clona 1, del transcrito maduro del gen *eIF4E*, para la línea celular MCF-7. Se aprecia una secuencia de buena calidad y con poco ruido de fondo, no se observa ningún cambio en los nucleótidos para las secuencias obtenidas.

Para la segunda clona a partir del transcrito maduro del gen *eIF4E*, de la línea celular MCF-7, también se realizó el alineamiento resultante de la secuencia esperada, con las secuencias obtenidas, empleando el programa MEGA6 (Figura 32) y BLAST (blastn) (Figura 33), en donde se encontró que no se presenta ningún cambio al igual que la clona 1, y que el porcentaje de similitud es del 100% correspondiente con la secuencia de interés.

El análisis del electroferograma obtenido mediante la secuenciación tipo Sanger, muestra que la secuencia obtenida tiene una buena resolución, al igual que el cromatograma de la secuencia para la clona 1. Con dicho electroferograma se confirma que, las secuencias obtenidas y la secuencia esperada presentan la misma correspondencia en todos sus nucleótidos (Figura 34).

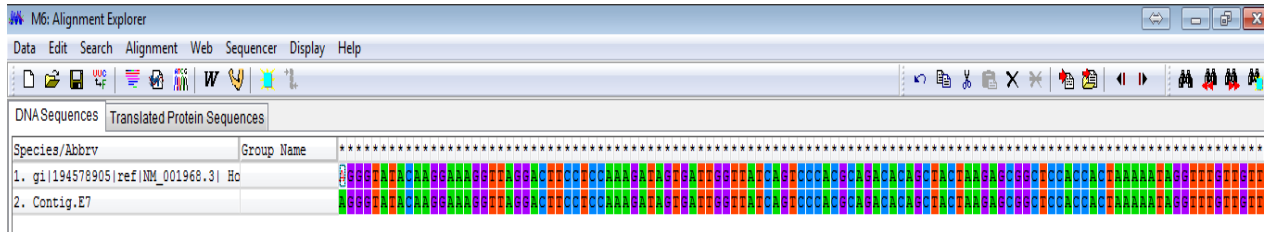


Figura 32. Análisis de la clona 2 con el programa MEGA6. Se presenta una porción representativa del alineamiento realizado, para la secuencia esperada (1) con las secuencias obtenidas (2), se aprecia que no existe ningún cambio en las secuencias obtenidas, para la región codificante de *EIF4E* de la línea celular MCF-7.

Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), transcript variant 1, mRNA

Sequence ID: ref|NM_001968.3|Length: 4749Number of Matches: 1

Range 1:	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1203 bits (651)	0.0	651/651 (100%)	0/651 (0%)	Plus/Plus	
Query 40	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	99			
Sbjct 1524	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	1583			
Query 100	AAAACGGAAATCTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	159			
Sbjct 1584	AAAACGGAAATCTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	1643			
Query 160	AACAGATGGGCACCTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAAGCAAACCTGGCAAGCAAACCTG	219			
Sbjct 1644	AACAGATGGGCACCTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAAGCAAACCTGGCAAGCAAACCTG	1703			
Query 220	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	279			
Sbjct 1704	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	1763			
Query 280	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTAAAGGATGGTATTGAGCCT	339			
Sbjct 1764	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTAAAGGATGGTATTGAGCCT	1823			
Query 340	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	399			
Sbjct 1824	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	1883			
Query 400	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAA	459			
Sbjct 1884	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAA	1943			
Query 460	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	519			
Sbjct 1944	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	2003			
Query 520	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	579			
Sbjct 2004	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	2063			
Query 580	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	639			
Sbjct 2064	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	2123			

```

Query 640 GCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCCTAAAAATAGGTTTGGTTGTT 690
      |||
Sbjct 2124 GCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCCTAAAAATAGGTTTGGTTGTT 2174

```

Figura 33. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 2. Se esquematiza el alineamiento realizado de las secuencias obtenidas, encontrando que el alineamiento global indica, que hay una similitud del 100% con la secuencia de la región codificante de eIF4E, como se esperaba por lo que no se presenta ningún tipo de mutación para esta clona.

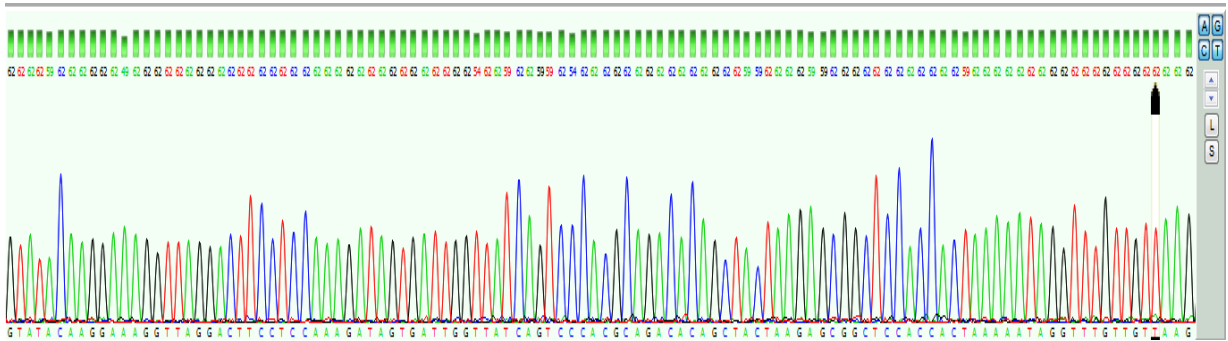


Figura 34. Electroferograma de la secuenciación para la clona 2 con el software DNA Baser. Se presenta el electroferograma para la clona 2, del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, para la línea celular MCF-7. El electroferograma presenta una buena resolución y un poco de ruido de fondo, se corrobora que, no hay ninguna mutación presente para esta clona.

Para la tercera clona de la región codificante de *eIF4E*, correspondiente a la línea celular MDA-MB-231, los alineamientos realizados con el programa MEGA6, determinaron que se presentan dos cambios de base, en el primero hay un cambio de base de guanina (G) por timina (T) en la posición 2145 y el otro cambio de base resultante es, de una citosina (C) por una adenina (A) en la posición 2147 con respecto a la secuencia de interés (Figura 35). Dicha mutación denominada transversión, se corroboró al realizar el alineamiento global con el programa BLAST (blastn), donde se presenta un porcentaje de identidad del 99% y existe una identidad de solo 649 nucleótidos, comparada con los 651 nucleótidos presentes en la secuencia de interés, debido a los dos cambios de base presentados (Figura 36).

Por su parte el electroferograma obtenido para esta clona, permitió corroborar la pérdida de las bases nucleotídicas, por lo que se presentan picos que, dan una señal para las bases nucleotídicas intercambiadas (Figura 37).

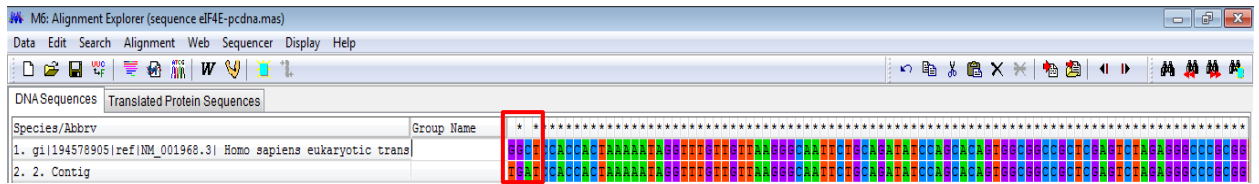


Figura 35. Análisis de la clona 3 con el programa MEGA6. Se presenta el resultado del fragmento representativo del alineamiento de la secuencia esperada (número 1) con las secuencias obtenidas (número 2), para la clona 3. En dicho fragmento se logran apreciar los cambios de base, de una guanina por timina en la posición y otro cambio de base de citosina por adenina (recuadro rojo).

Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), transcript variant 1, mRNA
 Sequence ID: ref|NM_001968.3| Length: 4749 Number of Matches: 1

Range 1: 1524 to 2174

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1192 bits (645)	0.0	649/651 (99%)	0/651 (0%)	Plus/Plus
Query 40	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	99		
Sbjct 1524	ATGGCGACTGTCGAACCGGAAACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAGAGGAG	1583		
Query 100	AAAACGGAAATCTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	159		
Sbjct 1584	AAAACGGAAATCTAATCAGGAGGTTGCTAACCCAGAACACTATATTAACATCCCCTACAG	1643		
Query 160	AACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAGCAAACCTTGGCAAGCAAACCTG	219		
Sbjct 1644	AACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTAAAAATGATAAAAGCAAACCTTGGCAAGCAAACCTG	1703		
Query 220	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	279		
Sbjct 1704	CGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTTTGGGCTCTGTACAACCATATCCAG	1763		
Query 280	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCT	339		
Sbjct 1764	TTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCACTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCT	1823		
Query 340	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	399		
Sbjct 1824	ATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGGAGGACGATGGCTAATTACATTGAACAAACAG	1883		
Query 400	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAA	459		
Sbjct 1884	CAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAGACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAA	1943		
Query 460	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	519		
Sbjct 1944	TCTTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCTGTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGT	2003		
Query 520	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	579		
Sbjct 2004	GATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAACAGAGAAGCTGTTACACATATAGGG	2063		
Query 580	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	639		
Sbjct 2064	AGGGTATACAAGGAAAGGTTAGGACTTCTCCAAAGATAGTGATTGGTTATCAGTCCCAC	2123		

```

Query   640   GCAGACACAGCTACTAAGAGCTGATCCACCCTAAAAATAGGTTTGTGTGT 690
      |||
Sbjct   2124   GCAGACACAGCTACTAAGAGCCGGCTCCACCCTAAAAATAGGTTTGTGTGT 2174

```

Figura 36. Alineamiento con BLAST (blastn) para la clona 3. Se presenta el alineamiento de las secuencias obtenidas, en donde se encontró un porcentaje de identidad del 99%, al encontrar una similitud de 649 nucleótidos de los 651 nucleótidos, que pertenecen a la secuencia de interés para el transcrito maduro que codifica para el gen de *eIF4E*; esto debido a los cambio de base en la secuencia obtenida los cuales se aprecian en color rojo.

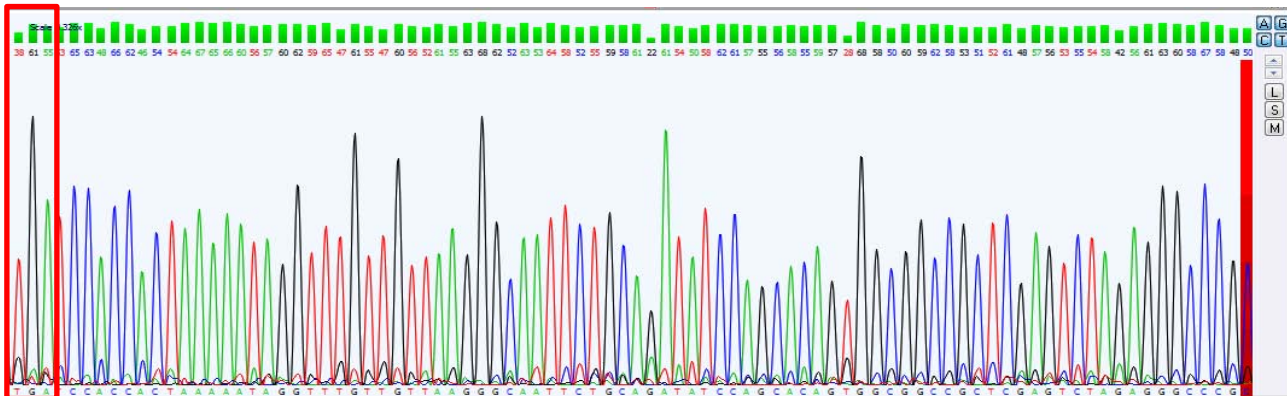


Figura 37. Electroferograma de la secuenciación para la clona 3. En el electroferograma para la clona 3 de la región codificante de *eIF4E*, para la línea celular MDA-MB-231, se observa que la calidad del electroferograma es buena, aunque se presenta un poco de ruido de fondo. Se pueden apreciar los picos que dan una señal para la base de T y otro pico que da señal para la base de A en lugar de las bases correspondientes G y C, respectivamente (recuadro rojo).

7.7 Análisis *in silico* para la proteína eIF4E

Después de realizar el análisis bioinformático, a nivel nucleotídico de las secuencias obtenidas, se analizaron a nivel de proteína, para ello se emplearon los programas ExpASy (SIB Bioinformatics Resource Portal) y BLAST (blastx) de NCBI. Así mismo, se utilizó el programa UniProt, para analizar los dominios de la proteína y posibles mutaciones que pudieran alterar la funcionalidad de la proteína (Tabla 10).

Para analizar las secuencias nucleotídicas a nivel proteico, se utilizó ExpASy translate que permite la traducción *in silico* de secuencias nucleotídicas a secuencias proteicas. Al realizar la traducción de las secuencias obtenidas, para las clonas 1 y 2 de *eIF4E* de la línea celular de MCF-7, se encontró que, todos los aminoácidos que codifican para la secuencia nucleotídica coinciden con la secuencia esperada, para la proteína de eIF4E (*Homo sapiens*) (Figura 38).

Para corroborar que la secuencia proteica no codificara para una proteína diferente a la de eIF4E (*Homo sapiens*), se empleo el algoritmo bioinformático BLAST (blastx) que permite realizar alineamientos a partir de una secuencia nucleotídica, contra su correspondiente secuencia proteica. Los resultados muestran que tanto la clona 1 como la clona 2 presentan un porcentaje de identidad y similitud del 100% , de los 217 aa que codifican para la proteína eIF4E (*Homo sapiens*), lo que indica la especificidad para la secuencia proteica esperada a nivel *in silico* (Figura 39).

Tabla 10. Dominios de la proteína eIF4E (Modificada de Consortium, 2015)

Características	Residuos	Posición(es)	Longitud	Descripción
Dominio	HPLQ	37 – 40	4	Unión EIF4EBP1/2/3
Dominio	WQ	56 – 57	2	Unión cap 7-metilguanosa RNAm
Dominio	WALYN	73 – 77	5	Unión EIF4EBP1/2/3
Dominio	WE	102 – 103	2	Unión cap 7-metilguanosa RNAm
Dominio	ETLLCLIG	132 – 139	8	Unión EIF4EBP1/2/3
Dominio	RAKGDK	157 – 162	6	Unión cap 7-metilguanosa RNAm
Dominio	TKS	205 – 207	3	Unión cap 7-metilguanosa RNAm

Secuencia Kozak	HA-tag	eIf4E-F
gccatgggctaccca	tacgatgttccagattacgct	atggcgactgtcgaaccg
A M G Y P Y D V P D Y A M A T V E P E T		
accctactcctaatccccgactacagaagaggagaaaacggaatctaatacaggaggtt		
T P T P N P P T T E E E K T E S N Q E V		
gctaaccagaacactatattaacatcccctacagaacagatgggcactctggtttttt		
A N P E H Y I K H P L Q N R W A L W F F		
aaaaatgataaaagcaaaacttggcaagcaaacctgcggtgatctccaagtttgatact		
K N D K S K T W Q A N L R L I S K F D T		
gttgaagacttttgggctctgtacaaccatatccagttgtctagtaatttaatgcctggc		
V E D F W A L Y N H I Q L S S N L M P G		
tgtgactactcactttttaaggatggtattgagcctatgtgggaagatgagaaaaaaa		

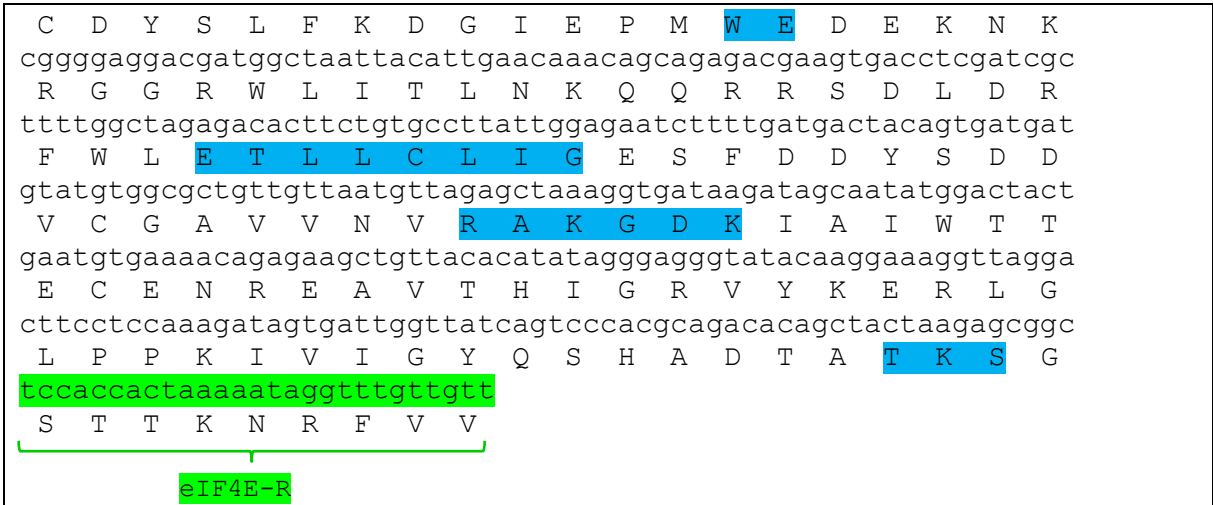


Figura 38. Secuencia traducida para las clonas 1 y 2. Se esquematiza la traducción de la secuencia nucleotídica obtenida mediante el programa ExPASy translate, para obtener la secuencia proteica . Se muestra la secuencia Kozak (rosa), el epítipo artificial de Hemaglutinina (gris), los oligonucleótidos de *eIF4E* sentido y antisentido (verde) y los dominios (azul) (ver tabla 10). Para estas clonas no se presenta ningún cambio a nivel de proteína de acuerdo al análisis *in silico*.

eukaryotic translation initiation factor 4E isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_001959.1|Length: 217 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 217

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps	Frame
411 bits(1057)	4e-143	217/217(100%)	217/217(100%)	0/217	+1
Query 49	MATVEPETPTPNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYIKHPLQNRWALWFFKNDKSKTWQANL				228
Sbjct 1	MATVEPETPTPNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYIKHPLQNRWALWFFKNDKSKTWQANL				60
Query 229	RLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGI EPMWEDEKNKRGRWLITLNKQ				408
Sbjct 61	RLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGI EPMWEDEKNKRGRWLITLNKQ				120
Query 409	QRRSDDLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECENREAVTHIG				588
Sbjct 121	QRRSDDLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECENREAVTHIG				180
Query 589	RVYKERLGLPPIKIVIGYQSHADTATKSGSTTKNRFVV 699				
Sbjct 181	RVYKERLGLPPIKIVIGYQSHADTATKSGSTTKNRFVV 217				

Figura 39. Alineamiento con BLAST (blastx) para las clonas 1 y 2 de *eIF4E*. El alineamiento de las secuencias obtenidas para las clonas 1 y 2, da como resultado un alineamiento específico con la secuencia esperada, para la proteína de *eIF4E* presentando una identidad del 100% en todos sus aminoácidos.

El análisis para la secuencia teórica proteica de la clona 3 para *eIF4E* de la línea celular de MDA-MB-231, con ExpASy translate mostró un cambio del aminoácido glicina por un codón de paro para la proteína eIF4E (*Homo sapiens*), dicho cambio no se encuentra reportado en la base de datos COSMIC (Figura 40).

Para corroborar este cambio en la secuencia proteica, al igual que en las clonas 1 y 2 se utilizó el logaritmo bioinformático BLAST (blastx) los resultados muestran que la clona 3 presenta un porcentaje de identidad y similitud del 99% de los 217 aa que codifican para la proteína eIF4E (*Homo sapiens*), lo que indica una falta en la especificidad para la secuencia proteica esperada a nivel *in silico* (Figura 41).

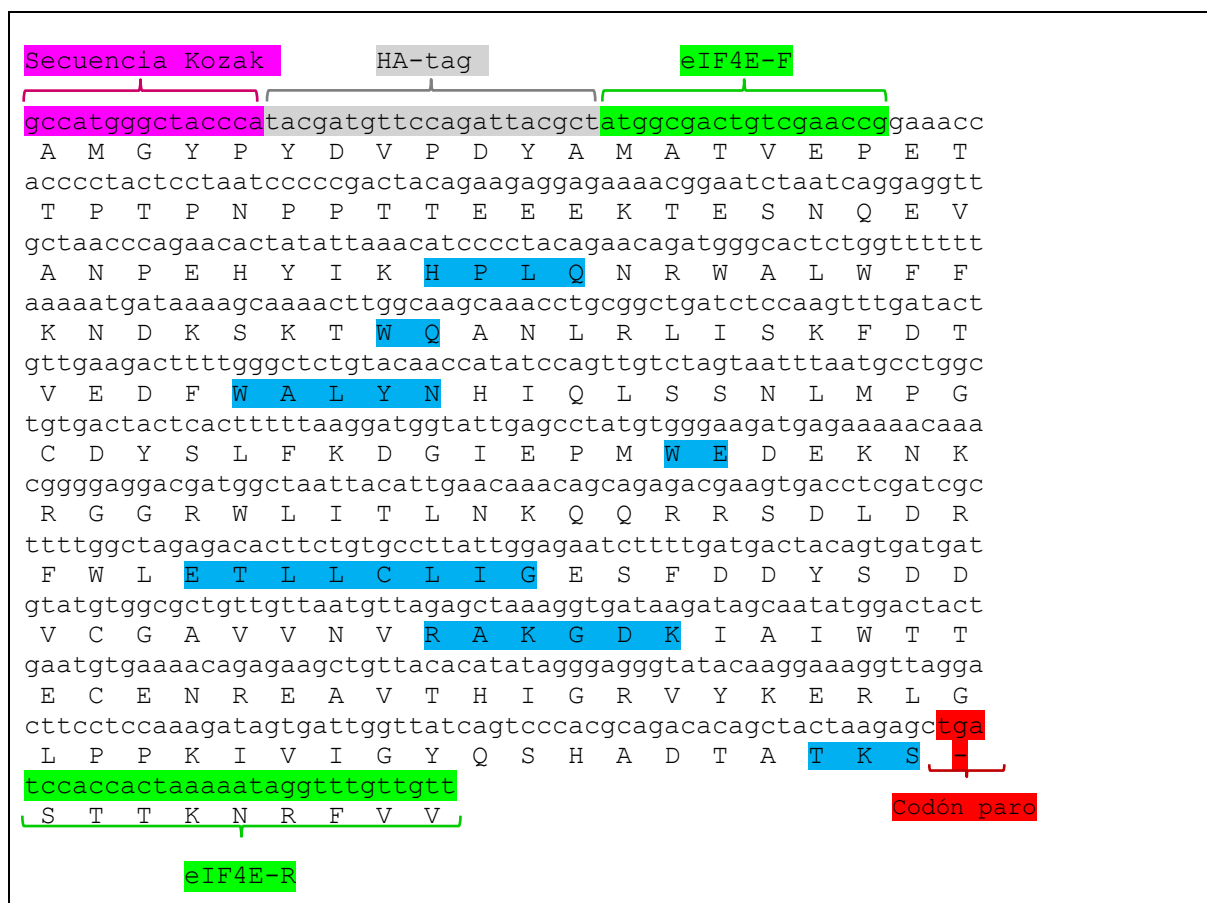


Figura 40. Secuencia traducida para la clona 3. Se incluye la traducción de la secuencia nucleotídica obtenida mediante el programa ExpASy translate, para obtener la secuencia proteica . Se muestra la secuencia Kozak (rosa), el epítipo artificial de Hemaglutinina (gris), los oligonucleótidos de *eIF4E* sentido y antisentido (verde) y sus dominios (azul). Para esta clona se codifica para un aminoácido diferente al de glicina dando como resultado la codificación para el codón de terminación de acuerdo al análisis *in silico* (rojo).

eukaryotic translation initiation factor 4E isoform 1 [Homo sapiens]
 Sequence ID: gi|4503535|ref|NP_001959.1| Length: 217 Number of Matches: 1
 Range 1: 1 to 217

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
383 bits (984)	4e-132	Compositional matrix adjust.	216/217 (99%)	216/217 (99%)	0/217 (0%)	+1
Query 40		MATVEPETTPPNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYIKHPLQNRWALWFFKNDKSKTWQANL			219	
Sbjct 1		MATVEPETTPPNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYIKHPLQNRWALWFFKNDKSKTWQANL			60	
Query 220		RLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGIEMWEDEKNKRGRWLITLNKQ			399	
Sbjct 61		RLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGIEMWEDEKNKRGRWLITLNKQ			120	
Query 400		QRRSDLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECENREAVTHIG			579	
Sbjct 121		QRRSDLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECENREAVTHIG			180	
Query 580		RVYKERLGLPPKIVIGYQSHADTATKS*STTTNRFVV	690			
Sbjct 181		RVYKERLGLPPKIVIGYQSHADTATKS■STTKNRFVV	217			

Figura 41. Alineamiento con BLAST (blastx) para las clona 3 de *eIF4E*. Se esquematiza el alineamiento realizado para la secuencia de la clona 3, el cual da como resultado una similitud del 99% para la proteína de *eIF4E* debido a la presencia de un codón de paro (rojo).

Después de obtener las secuencias proteicas teóricas, para cada una de las clonas obtenidas para *eIF4E*, se calcularon algunos parámetros fisicoquímicos a nivel *in silico*, empleando el programa ProtParam de ExPASy, dichos parámetros resultan importantes para la realización de estudios posteriores. Además del cálculo de estos parámetros para las secuencias obtenidas, también se realizó el cálculo para la secuencia esperada a fin de compararlos.

Al comparar los parámetros fisicoquímicos obtenidos para la secuencia proteica esperada con los de las secuencias obtenidas, todos los parámetros para las clonas 1 y 2, son correspondientes con los parámetros para la secuencia esperada. Sin embargo para la clona 3, se presenta un menor número de aminoácidos, con respecto a la secuencia esperada ya que encontró un codón de prematuro de terminación. Debido a ello, el peso molecular y el pI teórico, son parámetros que, también se encuentran disminuidos en la secuencia proteica obtenida, con respecto a la esperada (Tabla 11).

Tabla 11 . Características de las secuencias traducidas obtenidas contra la esperada.

Características	Secuencia esperada	Clonas 1 y 2	Clona 3
Número de aminoácidos	229	229	219
Peso molecular	26.440 kDa	26.440 kDa	25.350 kDa
pI Teórico	5.47	5.47	5.21
Número total residuos cargados negativamente (Asp +Glu)	34	34	34
Número total residuos cargados positivamente (Arg+ Lys)	28	28	26
Presencia de mutaciones	No	No	Si

8. DISCUSIÓN

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades de importancia mundial y a pesar de valiosos esfuerzos de investigación sus las tasas de incidencia y mortalidad han ido en aumento en los últimos años. Los informes a nivel mundial sobre el cáncer, indican que la prevención primaria, la detección temprana, el tratamiento y los cuidados paliativos pueden disminuir la incidencia y mortalidad, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer (Parkin et al., 2001). Actualmente una nueva opción terapéutica contra el cáncer que se encuentra en estudio es la denominada terapia molecular dirigida, un tipo de terapia médica personalizada diseñada para tratar el cáncer a partir del estudio de nuevos blancos moleculares específicos, que presentan alteraciones a nivel celular y molecular en el desarrollo del cáncer (Sawyers, 2004).

Dentro de los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de mama tiene la mayor tasa de incidencia y mortalidad en la población femenina (GLOBOCAN, 2012). Entre sus subtipos está el denominado cáncer de mama triple negativo, que presenta una mayor agresividad y recurrencia y para el cual aún no existen tratamientos efectivos (Bartsch et al., 2010). En los últimos años, la descripción de los subtipos moleculares de cáncer de mama, junto con la identificación de las diversas alteraciones genéticas y las vías de señalización implicadas, han llevado al estudio de nuevas terapias moleculares dirigidas (Higgins & Baselga, 2011). Una de estas estrategias terapéuticas se centra en el estudio del gen *eIF4E*, el cual se encuentra sobreexpresado en el cáncer de mama y en específico en el cáncer de mama triple negativo, por lo que las investigaciones realizadas van dirigidas a reprimir o disminuir sus niveles de expresión. Sin embargo, aún no existen estudios concluyentes ya que los mecanismos por los cuales, este gen le confiere a las células la capacidad para el desarrollo de propiedades tumorales, no se ha descrito (Pettersson et al., 2011)

En el presente estudio se realizó la clonación del transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, a partir de las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, a fin de obtener materiales biológicos caracterizados para realizar estudios posteriores. La clonación es una técnica de DNA recombinante en la que los cDNA o fragmentos de DNA genómico de una secuencia específicas se insertan en un vector de clonación, los

cuales se introducen en células hospederas (generalmente células de *E. Coli*) y se mantienen durante su duplicación. Esta técnica confiere la ventaja de desarrollar un gran número de moléculas de DNA idénticas, que incluyen la secuencia de interés ligada al vector, por lo que con este método cualquier gen puede ser aislado y purificado (Lodish, 2004).

Para llevar a cabo la clonación de la región codificante del gen *eIF4E* fue necesario diseñar oligonucleótidos específicos empleando herramientas bioinformáticas que permitieran la amplificación de toda la región codificante del gen específicamente para el genoma humano. La amplificación limitada a la región codificante permitirá realizar análisis a nivel de RNAm y proteico en estudios posteriores del gen *eIF4E*. Para ello se realizó la construcción de la proteína de fusión, añadiendo una secuencia consenso Kozak en el extremo 5'-terminal del oligonucleótido *forward* (sentido) para la región codificante de *eIF4E*. Dicha secuencia aumenta la eficiencia de la iniciación de la traducción y su secuencia de nucleótidos es (GCC)GCCRCCATGG, donde R es una purina (adenina o guanina) y se presenta con alta frecuencia en los genes de vertebrados. Estudios funcionales sobre la traducción en células indicaron que una purina en la posición -3 es crucial para la iniciación eficaz de la traducción, así como la presencia de una G en la posición +4 (inmediatamente después del codón ATG); esto debido a que cuando una pirimidina sustituye a la purina en la posición -3, la traducción se vuelve más sensible a los cambios en las posiciones -1, -2 y +4, lo que afecta la eficiencia de la traducción, ya que los niveles de expresión se pueden reducir hasta el 95% cuando la posición -3 se cambia de una purina a pirimidina. La posición +4 tiene menos influencia en los niveles de expresión donde se ve reducción de aproximadamente el 50% (Kozak, 1978; Kozak, 2002). Esta secuencia de RNAm es reconocida por el ribosoma como el sitio de inicio de la traducción, en el que se produce una proteína de acuerdo a la plantilla de codificación del gen transportado en esa molécula de RNAm (Nakagawa et al., 2008). De la misma manera se añadió una secuencia del epítipo artificial de HA (hemaglutinina) del virus de influenza, una secuencia peptídica corta ausente en las células humanas, también en el extremo 5'-terminal del oligonucleótido *forward* (sentido) para la región codificante de *eIF4E*. Esta adición se realizó para facilitar los análisis de detección a nivel proteico, utilizando anticuerpos para estudiar sus propiedades bioquímicas, así como su la purificación. Debido a que el epítipo HA no se

encuentra en las células humana, su empleo permitirá identificar la proteína HA-eIF4E de *eIF4E* endógeno.

Así mismo se realizó un análisis *in silico* con el programa PriDimer Check, para comprobar corroborar que entre los pares de oligonucleótidos diseñados no se presentara inter-complementariedad e incompatibilidad de los oligonucleótidos. Los pares de oligonucleótidos para *eIF4E* y *GAPDH* mostraron un valor de $\Delta G^\circ=0$. El valor de ΔG° , representa la cantidad de energía necesaria para romper completamente una estructura de DNA secundaria, por lo que a valores más negativos, mayor será la cantidad de energía necesaria para separar las hebras de DNA, si se forma una estructura secundaria. Esto resulta un factor importante en la reacción de PCR, debido a que, la energía está dada por la temperatura, por lo que a valores más negativos de ΔG° , mayor será la cantidad de energía necesaria para romper el dímero o lo que es lo mismo, se necesitan temperaturas más altas para separar los dímeros de oligonucleótidos, reduciendo la eficiencia de la reacción (Shen et al., 2010).

En términos generales, los valores de ΔG° más positivos que -7 kcal/mol son aceptables. En este caso el valor obtenido para ambos pares de oligonucleótidos es de cero, por lo que dicho valor indica que los oligonucleótidos no presentan ningún tipo inter-complementariedad.

Adicionalmente, el análisis realizado a nivel *in silico* corroboró que los oligonucleótidos diseñados eran específicos para el transcrito maduro de la isoforma 1 que codifica para el gen *eIF4E* humano, ya que solo se presenta un producto para el transcrito esperado y no para los otros transcritos alternativos las variantes 2 y 3, para las cuales no existen estudios acerca de su expresión a nivel de RNA o a nivel de proteína (Borden *et al.*, 2011). Dicho análisis se confirmó con la amplificación de *eIF4E* mediante la técnica de RT-PCR, empleando la variante de PCR-Touchdown ya que esta técnica permite una mayor especificidad del producto esperado. El resultado del empleo de esta técnica y los oligonucleótidos específicos resultó en la amplificación de los productos esperados, en cada una de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, presentando una sola banda del tamaño esperado de 651 pb, perteneciente a la isoforma 1, lo que confirma que los oligonucleótidos diseñados no amplifican para ningún otro transcrito alternativo, ni

para otros productos inespecíficos ya que se presenta una única banda, por lo que dichos productos son específicos para la región codificante de *eIF4E* (Figura 25).

Una vez obtenidos los productos de amplificación específicos para el transcrito maduro que codifica para el gen *eIF4E*, se realizó la reacción de clonación que confiere la ventaja de producir múltiples moléculas de DNA con la secuencia de interés. La generación del plásmido recombinante *eIF4E*-pcDNA3.1, se realizó mediante la ligación en el vector de expresión pcDNA 3.1/ V5-His TOPO, el cual contiene un promotor de CMV (citomegalovirus) que permite una eficiente y elevada expresión de la proteína recombinante, así como un sitio de clonación TOPO propiamente, que permite ligar el producto directamente de la PCR (Ver Anexo 2).

Posteriormente, se realizó la transformación en células competentes de *E.coli* con los productos de la ligación. El vector empleado presenta un origen de replicación del plásmido pUC, lo que le permite una alta tasa de del plásmido en células de *E. Coli*. La expresión de genes en *E. coli* ofrece un sistema conveniente para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes que de otro forma pueden ser difíciles de aislar a partir de células y tejidos.

El fenómeno de la transformación permite introducir vectores plasmídicos para ser expresados por células de *E. coli*, para ello el vector plasmídico empleado debe contener un gen seleccionable, más comúnmente un gen de resistencia a fármacos, el cual codifica una enzima que inactiva un antibiótico específico. El vector utilizado para la reacción de clonación, presenta el gen de resistencia a ampicilina (*ampr*) que codifica β -lactamasa, inactivando el antibiótico ampicilina. Después de que los vectores plasmídicos se introducen en células competentes de *E. coli*, las células que llevan el plásmido pueden ser fácilmente seleccionadas de las otras células que no contienen el plásmido por su cultivo en un medio que contiene ampicilina (Griffiths et al., 1999).

La transformación se realizó en células competentes, las incluidas en el kit pcDNA 3.1/ V5-His TOPO, eran las células TOP10 con una eficiencia de transformación de 1×10^9 cfu/ μ g DNA plasmídico, por lo que son ideales para la clonación de alta eficiencia y la propagación del plásmido. Sin embargo, al emplear estas células en diversos ensayos de

transformación, no se obtuvieron colonias, lo que se atribuye a una pérdida de la competencia debido a la temperatura, por un inadecuado transporte durante el envío de las mismas. Por lo que las células empleadas para llevar a cabo la transformación fueron, las células DH5 α de *E.coli*, que reportan una eficiencia de 1×10^6 cfu/ μ g DNA plasmídico. Cabe destacar que dichas células no fueron adquiridas de manera comercial, sino que fueron preparadas de manera convencional, lo que puede reducir la eficiencia. La obtención de muy pocas clonas durante la transformación sugiere que las células DH5 α que se emplearon tenían una baja eficiencia. Sin embargo, como se describe más adelante, no obstante que el número de clonas positivas fue bajo, fue posible obtener dos clonas con la secuencia codificante completa de *eIF4E*.

Para determinar la presencia del inserto recombinante y su orientación, se empleó el método de PCR de colonia, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos que flanquean la los sitios de inserción de la secuencia de interés en el vector de expresión, el oligonucleótido del promotor T7 y el de BGH. Asimismo se empleó el oligonucleótido específico antisentido de la región codificante del gen *eIF4E*. El uso de oligonucleótidos específicos proporciona información acerca de la especificidad y el tamaño del inserto, mientras que el uso de cebadores específicos del vector permite la detección de múltiples construcciones simultáneamente. Por lo que en la amplificación de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos de la región codificante del gen con oligos específicos del vector. Se encontró que, al usar el oligonucleótido específico sentido EIF4E-F, las clonas con la orientación correcta amplificaban sólo con el cebador T7 y las clonas con orientación incorrecta solo amplificaban con el cebador de BGH. Con este método se encontraron 3 clonas en la orientación correcta, 2 para la línea celular de MCF-7 y una para la línea celular de MDA-MB-231 (Figura 28).

La confirmación de la orientación de las clonas obtenidas, así como la identificación de mutaciones presentes, se realizó empleando el método de Secuenciación tipo Sanger, ya que el objetivo principal en el análisis genético de un gen, es determinar la secuencia de sus nucleótidos. Este tipo de secuenciación es el método de secuenciación estándar de oro, ya que genera datos de secuenciación fiables de alta precisión (Passarge, 2009). Los análisis de las secuencias a nivel nucleótido mostraron que para las clonas 1 y 2 no se presentan

cambios en sus secuencias nucleotídicas al comparar con la secuencia de referencia de *eIF4E*, mientras que para la clona 3 se presentan dos cambios de base, el de una guanina por una timina en la posición 1245 y otro cambio de citosina por adenina en la posición 1247. Este tipo de mutaciones por cambios de base de nucleótidos se conocen como transversiones, ya que se presenta un cambio de base de una purina (G) por una pirimidina(T) y el cambio de una pirimidina(C) por una purina(A) (Pierce, 2009). La presencia de estas mutaciones en las secuencias obtenidas no se encuentran reportadas para el gen *eIF4E* en las posiciones encontradas, para las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231, de acuerdo con la base de datos COSMIC (Forbes et al., 2008). Por lo que los resultados encontrados para las secuencias obtenidas de la clona 3, se atribuyen a una menor fidelidad de la Taq polimerasa, ya que ésta carece de actividad de exonucleasa presentando una tasa de error de aproximadamente 1 error por 2.2×10^5 nucleótidos incorporados (McInerney et al., 2014)

Los cambios presentados a nivel nucleotídico pueden repercutir a nivel proteico. En el caso de las secuencias obtenidas para cada una de las clonas a nivel de proteína se encontró que las clonas 1 y 2 no presentaron ningún cambio a nivel de aminoácido. Al corroborar los resultados empleando el algoritmo informático Blastx se encontró que las secuencias obtenidas para estas clonas corresponden a la proteína eIF4E, ya que presentan una identidad del 100% en todos los aminoácidos, además el análisis de los dominios empleando la base de datos UniProt, demostró que no existe alteración en ninguno de ellos.

Sin embargo, el cambio a nivel nucleotídico presentado en la clona 3, da lugar a la codificación de un codón de paro prematuro en lugar de una glicina. Este cambio se conoce como mutación sin sentido o de paro, una mutación puntual que da como resultado una proteína acortada, puesto que la traducción no progresa más allá del punto donde ocurrió la mutación, por lo que puede perderse la funcionalidad de la proteína, a pesar de que ninguno de los dominios se vio afectado (Lewin et al., 2014) .

Así mismo, se realizó un análisis de las secuencias proteicas teóricas obtenidas, determinando algunos parámetros fisicoquímicos *in silico* y se compararon con los parámetros para la secuencia esperada, los cuales fueron iguales a la secuencia esperada para las clonas 1 y 2. No obstante para la clona 3, el número de aminoácidos fue menor

debido a la presencia del codón de terminación, el peso molecular también disminuye con una diferencia de 1.09 kDa, de la misma manera el pI teórico también fue menor con una diferencia de 0.26.

En conjunto los análisis realizados indican que, para las clonas 1 y 2 no existe ninguna alteración en las propiedades de la proteína resultante, es decir la funcionalidad de la proteína no se ve afectada. Sin embargo los análisis para la clona 3 indican que la proteína esperada estaría incompleta. Pese a ello es necesario realizar estudios posteriores para corroborar la funcionalidad de las proteínas resultantes de las clonas obtenidas.

9. CONCLUSIONES

1. El diseño de oligonucleótidos específicos, permitió la correcta amplificación de los productos para la región codificante de *eIF4E*, a partir de las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
2. Se ligaron los productos PCR de la región codificante del gen *eIF4E* en el vector de expresión, para la obtención del plásmido recombinante pcDNA-*eIF4E*.
3. Mediante la transformación química en células competentes de *E.coli*, se obtuvieron varias clonas con el plásmido recombinante.
4. El tamizaje de las clonas mediante PCR de colonia permitió establecer que 3 de las clonas, presentaban en la orientación apropiada el inserto de interés.
5. El análisis de la secuenciación tipo Sanger, corroboró la orientación de las clonas obtenidas y permitió el análisis de la presencia de mutaciones en las mismas.
6. Todas las clonas secuenciadas presentaron las secuencias del epítipo HA y Kozak.
7. La secuencia para una de las clonas obtenidas, presentó dos cambios de nucleótido; uno de ellos dando lugar a la presencia de un codón de terminación.
8. Se obtuvieron dos clonas con 100% de identidad a nivel de nucleótidos, con la orientación y el marco de lectura correctos.
9. Las clonas 1 y 2 presentan las características necesarias para ser usadas como reactivo biológico en futuros estudios a nivel bioquímico, celular y molecular en el cáncer de mama.

10.REFERENCIAS

- Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J., & Pietenpol, J. A. (2015). Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer*, 121(1), 8–16.
- Alain, T., Morita, M., Fonseca, B. D., Yanagiya, A., Siddiqui, N., Bhat, M., Sonenberg, N. (2012). eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Research*, 72(24), 6468–6476.
- Alizart, M., Saunus, J., Cummings, M., & Lakhani, S. R. (2012). Molecular classification of breast carcinoma. *Diagnostic Histopathology*, 18(3), 97–103.
- Allan, J. M., & Travis, L. B. (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 5(12), 943–955.
- American Cancer Society.(2014). Breast cancer. Recuperado el 26 febrero de 2015, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–2116.
- Anders, C. K. & Carey, L. A. (2009). Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9(Suppl 2), S73–S81.
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 430–436.
- Anderson, P., Kedersha, N., & Ivanov, P. (2014). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1849(7), 861-870.
- Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., & Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11(5), 717–727.
- Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez-Sánchez V y Villarrea P. (2011). Oncoguía: Cáncer de Mama. *Cancerología*, 6 (2011): 77 - 86.
- Armitage, P., & Doll, R. (1954). The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8(1), 1–12.
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9–18.
- Assouline, S., Culjkovic, B., Cocolakis, E., Rousseau, C., Beslu, N., Amri, A., Borden, K. L. B. (2009). Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood*, 114(2), 257–260.
- Avdulov, S., Herrera, J., Smith, K., Peterson, M., Gomez-Garcia, J. R., Beadnell, T. C., Polunovsky, V. A. (2015). eIF4E Threshold Levels Differ in Governing Normal and Neoplastic Expansion of Mammary Stem and Luminal Progenitor Cells. *Cancer Research*, 75(4), 687–697.
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Incorporation*, 24(2), 157–167.
- Balagopal, V., & Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and Stress granules: States and Fates of Eukaryotic mRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 403–408.
- Barcellos-Hoff, M. H., Lyden, D., & Wang, T. C. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 511–518.
- Bardeesy, N., & Sharpless, N. E. (2006). RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10(6), 451–453.
- Bardou, V.-J., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K., & Clark, G. M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status

- alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10), 1973–1979.
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 100, 9–20.
- Bartsch, R., Ziebermayr, R., Zielinski, C. C., & Steger, G. G. (2010). Triple-negative breast cancer. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 160(7-8), 174–181.
- Bashkirov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J.-M., & Heyer, W.-D. (1997). A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates. *The Journal of Cell Biology*, 136(4), 761–773.
- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., Clapp, R., Montagnier, L., Epstein, S., & Sasco, A. J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental Research*, 105(3), 414–429.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 401–410.
- Bitterman, P. B., & Polunovsky, V. A. (2014). eIF4E-mediated translational control of cancer incidence. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1849(7), 774–80.
- Borden, KLB, Culjkovic-Kraljacic, B, Volpon, L. (2011). eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 15(2):159-168.
- Breast Cancer Prevention. Recuperado el 18 de febrero 2015 de <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/breast/Patient/page1>.
- Cabrera, J. L., & Sánchez, A. H. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. España: Elsevier.
- Cameron, D., Brown, J., Dent, R., Jackisch, C., Mackey, J., Pivot, X., Bell, R. (2013). Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 14(10), 933–942.
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., Dorn, J. F., Huttlin, E. L., Maddox, P. S., Gygi, S. P., & Roux, P. P. (2012). Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 32(22), 4572–4584.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404.
- Charames, G. S., & Bapat, B. (2003). Genomic Instability and Cancer. *Current Molecular Medicine*, 3(7), 589–596.
- Clarke, Hanna J., Joseph E. Chambers, Elizabeth Liniker, and Stefan J. Marciniak. (2014) Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy. *Cancer Cell*, 25(5), 563–73.
- ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health(2014). Recuperado el 27 de marzo 2015 de, <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=eIf4E&Search=Search>.
- Consortium, T. U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212.
- Costa, Ana, Alix Scholer-Dahirel, and Fatima Mechta-Grigoriou. “The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer Cells and Their Microenvironment.” *Seminars in Cancer Biology* 25 (April 2014): 23–32.
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L., Ezzati, M., & Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499), 1784–1793.
- Dantés, O. G., Sesma, S., Becerril, V. M., Knaul, F. M., Arreola, H., & Frenk, J. (2011). Sistema de salud de México. *Salud Pública de México*, 53, s220–s232.

- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Peto, R. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381(9869), 805–816.
- Davis, S. L., Eckhardt, S. G., Tentler, J. J., & Diamond, J. R. (2014). Triple-negative breast cancer: bridging the gap from cancer genomics to predictive biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(3), 88–100.
- De Benedetti, A., & Graff, J. R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*, 23(18), 3189–3199.
- Decker, C. J., Teixeira, D., & Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 179(3), 437–449.
- Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9).
- De Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P. J., van Engeland, M., & Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(2), 183–192.
- Di Bisceglie, A. M. (2009). Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(5 Suppl), S56–S60.
- Diccionario de cáncer. Recuperado 12 de febrero 2015 de, <http://m.cancer.gov/es/diccionario>.
- Dixon, K., & Koprás, E. (2004). Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 441–448.
- Donnelly, Neysan, Adrienne M. Gorman, Sanjeev Gupta, and Afshin Samali. (2013). The eIF2 α Kinases: Their Structures and Functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(19), 3493–3511.
- Drake R, Vogl A, Mitchell A. (2010). *Gray Anatomía para estudiantes*. (2a ed.) España: Elsevier.
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews. Immunology*, 6(11), 836–848.
- Eisinger, F., Viguier, J., Touboul, C., Coscas, Y., Pivot, X., Blay, J.-Y., Morère, J.-F. (2015). Social stratification, risk factor prevalence and cancer screening attendance. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 24, S77–81.
- Engelbraaten, O., Volland, H. K. M., & Børresen-Dale, A.-L. (2013). Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1064–1074.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., & Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 9–22.
- Eystathiou, T., Chan, E. K. L., Tenenbaum, S. A., Keene, J. D., Griffith, K., & Fritzler, M. J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1338–1351.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Iggo, R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 24(29), 4660–4671.
- Ferraiuolo, M. A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E. L., Schoenberg, D. R., & Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *The Journal of Cell Biology*, 170(6), 913–924.
- Filipowicz, W., Furuichi, Y., Sierra, J. M., Muthukrishnan, S., Shatkin, A. J., & Ochoa, S. (1976). A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(5), 1559–1563.

- Flowers, A., Chu, Q. D., Panu, L., Meschonat, C., Caldito, G., Lowery-Nordberg, M., & Li, B. D. L. (2009). Eukaryotic initiation factor 4E overexpression in triple-negative breast cancer predicts a worse outcome. *Surgery*, 146(2), 220–226.
- Forbes, S. A., Bhamra, G., Bamford, S., Dawson, E., Kok, C., Clements, J., Stratton, M. R. (2008). The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Current Protocols in Human Genetics*. USA: Board.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948.
- Franks, T. M., & Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular Cell*, 32(5), 605–615.
- Freedman, A. N., Yu, B., Gail, M. H., Costantino, J. P., Graubard, B. I., Vogel, V. G., ... McCaskill-Stevens, W. (2011). Benefit/risk assessment for breast cancer chemoprevention with raloxifene or tamoxifen for women age 50 years or older. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(17), 2327–2333.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), p11.
- Gao, M., Rychlik, W., & Rhoads, R. E. (1998). Cloning and Characterization of Human eIF4E Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4622–4628.
- Ghose, A., Kundu, R., Toumeh, A., Hornbeck, C., & Mohamed, I. (2015). A review of obesity, insulin resistance, and the role of exercise in breast cancer patients. *Nutrition and Cancer*, 67(2), 197–202.
- GLOBOCAN IARC (2012). GLOBOCAN Project, Cancer Incidence. Mortality and Prevalence worldwide. Recuperado el 27 noviembre 2014, de <http://globocan.iarc.fr/ia/world/atlas.html>.
- Greenwald, H. P. (1992). *Who Survives Cancer?*. University of California Press.
- Griffiths, A. J., Gelbart, W. M., Miller, J. H., Lewontin, R. C. (1999). *Modern Genetic Analysis*. USA: Macmillan.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–899.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanf, V., & Hanf, D. (2014). Reproduction and breast cancer risk. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 9(6), 398–405.
- Heikkinen, T., Korpela, T., Fagerholm, R., Khan, S., Aittomäki, K., Heikkilä, P., Nevanlinna, H. (2013). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) expression is associated with breast cancer tumor phenotype and predicts survival after anthracycline chemotherapy treatment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 141(1), 79–88.
- Herceg, Z., & Hainaut, P. (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 1(1), 26–41.
- Higgins, M. J., & Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3797–3803.
- Hoeflerlin, L. A., E.Chalfant, C., & Park, M. A. (2013). Challenges in the Treatment of Triple Negative and HER2-Overexpressing Breast Cancer. *Journal of Surgery and Science*, 1(1), 3–7.
- Holland-Frei Cancer Medicine*. (2003) (6th ed.). USA: BC Decker.
- Hsieh, A. C., & Ruggero, D. (2010). Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(20), 4914–4920.

- Hu, A., Sun, M., Yan, D., & Chen, K. (2014). Clinical significance of mTOR and eIF4E expression in invasive ductal carcinoma. *Tumori*, 100(5), 541–546.
- Huang, Lue, Stéphanie Mollet, Sylvie Souquere, Florence Le Roy, Michèle Ernoult-Lange, Gérard Pierron, François Dautry, and Dominique Weil. Mitochondria Associate with P-Bodies and Modulate microRNA-Mediated RNA Interference. (2011). *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (27),24219–30.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 16961–16966.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2015). Most types of cancer not due to “bad luck”. Recuperado el 25 de marzo 2015 de, http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr231_E.pdf.
- Instituto Nacional del Cáncer/ EUA. (2014). Cáncer de seno (mama): Tratamiento (PDQ®). Recuperado el 10 de diciembre 2014 de, <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page1>.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2013). Estadísticas a propósito del Día Internacional de Cáncer de Mama. Recuperado el 16 de diciembre 2014 de <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/ma ma0.pdf>.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2014). Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer. Recuperado el 17 de marzo de 2015 de <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/can cer0.pdf>
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Lührmann, R., & Achsel, T. (2002). The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8(12), 1489–1501.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Chan, E. K. L. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1267–1274.
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–548.
- Joshi, B., Cameron, A., & Jagus, R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 271(11), 2189–2203.
- Kaehler, Christian, Jörg Isensee, Tim Hucho, Hans Lehrach, and Sylvia Krobitsch. (2014) 5-Fluorouracil Affects Assembly of Stress Granules Based on RNA Incorporation. *Nucleic Acids Research*, 42 (10) : 6436–47.
- Kasum, M., Beketić-Orešković, L., & Orešković, S. (2014). Subsequent pregnancy and prognosis in breast cancer survivors. *Acta Clinica Croatica*, 53(3), 334–341.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 169(6), 871–884.
- Kenemans, P., Verstraeten, R. A., & Verheijen, R. H. M. (2008). Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 61(1-2), 141–150.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W43–W46.
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51, s335–s344.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.

- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, 15(4), 1109–1123.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299(1-2), 1–34.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767.
- Lewin, B., Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2014). *Lewin's Genes XI*. USA: Jones & Bartlett Publishers.
- Liedtke, C., Bernemann, C., Kiesel, L., & Rody, A. (2013). Genomic profiling in triple-negative breast cancer. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 8(6), 408–413.
- Lodish, H. (2004). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287–294.
- Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M. J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M. J., & Schmidt, E. V. (2005). hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6436–6453.
- Makhlouf, A. A., Namboodiri, A. M., & McDermott, P. J. (2001). Transcriptional regulation of the rat eIF4E gene in cardiac muscle cells: the role of specific elements in the promoter region. *Gene*, 267(1), 1–12.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955–960.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L. W., & Sonenberg, N. (2004). eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene*, 23(18), 3172–3179.
- Mancini, P., Angeloni, A., Risi, E., Orsi, E., & Mezi, S. (2014). Standard of care and promising new agents for triple negative metastatic breast cancer. *Cancers*, 6(4), 2187–2223.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Burley, S. K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*, 89(6), 951–961.
- McCoy, M., Stavridi, E. S., Waterman, J. L., Wieczorek, A. M., Opella, S. J., & Halazonetis, T. D. (1997). Hydrophobic side-chain size is a determinant of the three-dimensional structure of the p53 oligomerization domain. *The EMBO Journal*, 16(20), 6230–6236.
- McInerney, P., Adams, P., & Hadi, M. Z. (2014). Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*, e287430.
- McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 321(7261), 624–628.
- Michielsen, P., & Ho, E. (2011). Viral hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 74(1), 4–8.
- Miller, T. W., Forbes, J. T., Shah, C., Wyatt, S. K., Manning, H. C., Olivares, M. G., Arteaga, C. L. (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2-overexpressing cancer cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(23), 7266–7276.
- Miller, R. A., Waters, L. L., Mody, D. R., & Tams, K. C. (2015). Squamous cell carcinoma of the cervix: a cytology-histology-human papillomavirus correlation in clinical practice. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(6), 776–781.

- Miyagi, Y., Sugiyama, A., Asai, A., Okazaki, T., Kuchino, Y., & Kerr, S. J. (1995). Elevated levels of eukaryotic translation initiation factor eIF-4E, mRNA in a broad spectrum of transformed cell lines. *Cancer Letters*, 91(2), 247–252.
- Morère, J.-F., Viguier, J., Touboul, C., Pivot, X., Blay, J.-Y., Coscas, Y., ... Eisinger, F. (2015). Lung cancer risks, beliefs and healthcare access among the underprivileged. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 24 Suppl, S82–86.
- Moschetta, M., Reale, A., Marasco, C., Vacca, A., & Carratù, M. R. (2014). Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3801–3813.
- Munagala, R., Aqil, F., & Gupta, R. C. (2011). Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 236–245.
- Nakagawa, S., Niimura, Y., Gojobori, T., Tanaka, H., & Miura, K. (2008). Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(3), 861–871.
- Nee, P. W. (2013). *The Key Facts on Cancer Prevention: Everything You Need to Know About Cancer Prevention*. pp.76
- Network, T. C. G. A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70.
- Nguyen, D. X., & Massagué, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews. Genetics*, 8(5), 341–352.
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 274–284.
- Nordling, C. O. (1953). A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism. *British Journal of Cancer*, 7(1), 68–72.
- Olszewska, M., Bujarski, J. J., & Kurpisz, M. (2012). P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review. *Cell Biochemistry and Function*, 30(3), 177–182.
- OMS | Cáncer. Recuperado el 3 diciembre 2014 de, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OMS | Cáncer de mama: prevención y control. Recuperado el 8 enero 2015 de, <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/es/>
- OMS | Las 10 causas principales de defunción en el mundo. Recuperado el 23 marzo 2015 de, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>
- Ossovskaya, V., Wang, Y., Budoff, A., Xu, Q., Lituev, A., Potapova, O., Daraselia, N. (2011). Exploring Molecular Pathways of Triple-Negative Breast Cancer. *Genes & Cancer*, 2(9), 870–879.
- O’Toole, S. A., Beith, J. M., Millar, E. K. A., West, R., McLean, A., Cazet, A., Oakes, S. R. (2013). Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 66(6), 530–542.
- Palacio-Mejía, L. S., Lazcano-Ponce, E., Allen-Leigh, B., & Hernández-Ávila, M. (2009). Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública de México*, 51, s208–s219.
- Pan, Xiangyang, Dongmei Xiong, Xue Yao, Yu Xin, Luyu Zhang, and Junxia Chen. (2012). Up-Regulating Ribonuclease Inhibitor Inhibited Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis in Murine Melanoma Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44 (6), 998–1008.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International Journal of Cancer*, 94(2), 153–156.
- Passarge, E. (2009). *GENETICA TEXTO Y ATLAS*. Argentina: Médica Panamericana.

- Pelletier, J., Brook, J. D., & Housman, D. E. (1991). Assignment of two of the translation initiation factor-4E (EIF4EL1 and EIF4EL2) genes to human chromosomes 4 and 20. *Genomics*, 10(4), 1079–1082.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.
- Pettersson, F., Rincon, S. V. del, Emond, A., Huor, B., Ngan, E., Ng, J., Miller, W. H. (2015). Genetic and Pharmacologic Inhibition of eIF4E Reduces Breast Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cancer Research*, 75(6), 1102–1112.
- Pettersson, F., Yau, C., Dobocan, M. C., Culjkovic-Kraljacic, B., Retrouvey, H., Retrouvay, H., Miller, W. H. (2011). Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), 2874–2884.
- Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana.
- Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(3 Suppl), 962–970.
- Player, A., Barrett, J. C., & Kawasaki, E. S. (2004). Laser capture microdissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(6), 831–840.
- Porter, P. L. (2009). Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública de México*, 51, s141–s146.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5), R68.
- Ramalingam, S., Gediya, L., Kwegyir-Afful, A. K., Ramamurthy, V. P., Purushottamachar, P., Mbatia, H., & Njar, V. C. O. (2014). First MNKs degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 5(2), 530–543.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439.
- Rock, C. L., Doyle, C., Demark-Wahnefried, W., Meyerhardt, J., Courneya, K. S., Schwartz, A. L., Gansler, T. (2012). Nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(4), 242–274.
- Ross MH y Wojciech Pawlina. (2013). *Histología: Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular*. Argentina: Médica Panamericana.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology*. (4th ed.). USA: Oxford University Press. pp.530
- Safra, M., Solomon, I., Shmueli, O., Lapidot, M., Shen-Orr, S., Adato, A., Lancet, D. (2002). GeneCards™ 2002: towards a complete, object-oriented, human gene compendium. *Bioinformatics*, 18(11), 1542–1543.
- Sauter, E. R., & Daly, M. B. (2010). *Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection*. USA: Springer US.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294–297.
- Schellenberg, G. D., Dawson, G., Sung, Y. J., Estes, A., Munson, J., Rosenthal, E., Wijsman, E. M. (2006). Evidence for multiple loci from a genome scan of autism kindreds. *Molecular Psychiatry*, 11(11), 1049–1060, 979.
- Secretaría de Salud (SSA) y Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS). (2013). Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 5 de diciembre 2014 de, <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
- Secretaría de Salud (SSA). (2013). México: Numeralía de Cáncer de Mama. Boletín Epidemiológico. 30(26).
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Zhang, C. (2010). MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BioMed Central Bioinformatics*, 11(1), 143.

- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235–246.
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620), 805–808.
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(7), 1291–9.
- Sledge, G. W., Mamounas, E. P., Hortobagyi, G. N., Burstein, H. J., Goodwin, P. J., & Wolff, A. C. (2014). Past, Present, and Future Challenges in Breast Cancer Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 32(19), 1979–86.
- Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C., & Shatkin, A. J. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10), 4843–4847.
- Sonenberg, N., Rupprecht, K. M., Hecht, S. M., & Shatkin, A. J. (1979). Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4345–4349.
- Sonenberg, N., Trachsel, H., Hecht, S., & Shatkin, A. J. (1980). Differential stimulation of capped mRNA translation in vitro by cap binding protein. *Nature*, 285(5763), 331–333.
- Soni, A., Akcakanat, A., Singh, G., Luyimbazi, D., Zheng, Y., Kim, D., Meric-Bernstam, F. (2008). eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1782–1788.
- Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., & Weil, D. (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3619–3626.
- Stearns, V., Schneider, B., Henry, N. L., Hayes, D. F., & Flockhart, D. A. (2006). Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 886–893.
- Stevens, K. N., Vachon, C. M., & Couch, F. J. (2013). Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, 73(7), 2025–2030.
- Strudwick, S., & Borden, K. L. B. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 70(1), 10–22.
- Swetloff, Adam, Beatrice Conne, Joachim Huarte, Jean-Luc Pitetti, Serge Nef, and Jean-Dominique Vassalli. (2009). Dcp1-Bodies in Mouse Oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 20(23), 4951–61.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A., & Boccaccio, G. L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cellular Signalling*, 23(2), 324–334.
- Tomasetti, C., Marchionni, L., Nowak, M. A., Parmigiani, G., & Vogelstein, B. (2015). Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 118–123.
- Tomoo, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Miura, K. (2002). Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region. *The Biochemical Journal*, 362(Pt 3), 539–544.
- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Orolicki, S., Skrabanek, L. A., Tremblay, M., Hoang, T., & Borden, K. L. B. (2009). Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), 1152–1162.

- Tortora, G.J., Derrickson, B. (2006). *Principios de anatomía y fisiología*. Argentina:Médica Panamericana.
- Trosko, J. E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 43–48.
- Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, 23(suppl 10), x207–x210.
- Vichnin, M., Bonanni, P., Klein, N. P., Garland, S. M., Block, S. L., Kjaer, S. K., Kuter, B. J. (2015). An Overview of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Safety - 2006 to 2015. *The Pediatric Infectious Disease Journal*.
- Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D153–159.
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 465(1), 1–14.
- Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular Oncology*, 4(3), 192–208.
- Wheater, M. J., Johnson, P. W., & Blaydes, J. P. (2010). The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biology & Therapy*, 10(7), 728–735.
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473–486.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
- Xu, H., Eirew, P., Mullaly, S. C., & Aparicio, S. (2014). The omics of triple-negative breast cancers. *Clinical Chemistry*, 60(1), 122–133.
- Yang, Zheng, Andrew Jakymiw, Malcolm R. Wood, Theophany Eystathioy, Robert L. Rubin, Marvin J. Fritzler, and Edward K. L. Chan. (2004). GW182 Is Critical for the Stability of GW Bodies Expressed during the Cell Cycle and Cell Proliferation. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5567–78.
- Yang, H., Li, L.-W., Shi, M., Wang, J.-H., Xiao, F., Zhou, B., Xu, L. (2012). In vivo study of breast carcinoma radiosensitization by targeting eIF4E. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4), 878–883.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y. A., Zhu, W., He, X., & Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 182(1), 89–101.
- Zhou, F., Yan, M., Guo, G., Wang, F., Qiu, H., Zheng, F., Xia, L. (2011). Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 28(4), 1302–1307.
- Zhu, N., Gu, L., Findley, H. W., & Zhou, M. (2005). Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(4), 1272–1279.

11.ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos, cepas y líneas celulares

Microorganismos

Cepa de *Escherichia coli* para clonación DH5 α . Genotipo: F $^-$ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1*.

Líneas celulares y mantenimiento

MCF-7, línea celular de cáncer de mama ER (+), de glándula mamaria resultante del lugar de la metástasis: derrame pleural. Proveniente, de una mujer caucásica de 69 años edad. Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino y 0.01 mg/ml insulina bovina, mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO $_2$.

MDA-MB-231, línea celular de cáncer de mama triple negativo, de glándula mamaria resultante del lugar de la metástasis: derrame pleural. Proveniente, de una mujer caucásica de 51 años de edad. Las células se crecieron en medio L-15(Leibovitz), suplementado con 10% suero fetal bovino, mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda sin CO $_2$.

Medio LB (Luria-Bertani)

Medio nutritivo para el mantenimiento y crecimiento de cepas recombinantes de *E.coli*. Se disuelven 10 g triptona (peptona de caseína), 5g extracto de levadura y 10 g NaCl en 950 ml de agua desionizada. Ajustando el pH a 7.0 con NaOH y llevando a un volumen final de 1L. Para el medio sólido, se añaden 15g/L agar. Esterilizando en autoclave 20 minutos a 15 psi.

Para la selección de transformantes se añadieron a los medios ampicilina (50 μ g/ml).

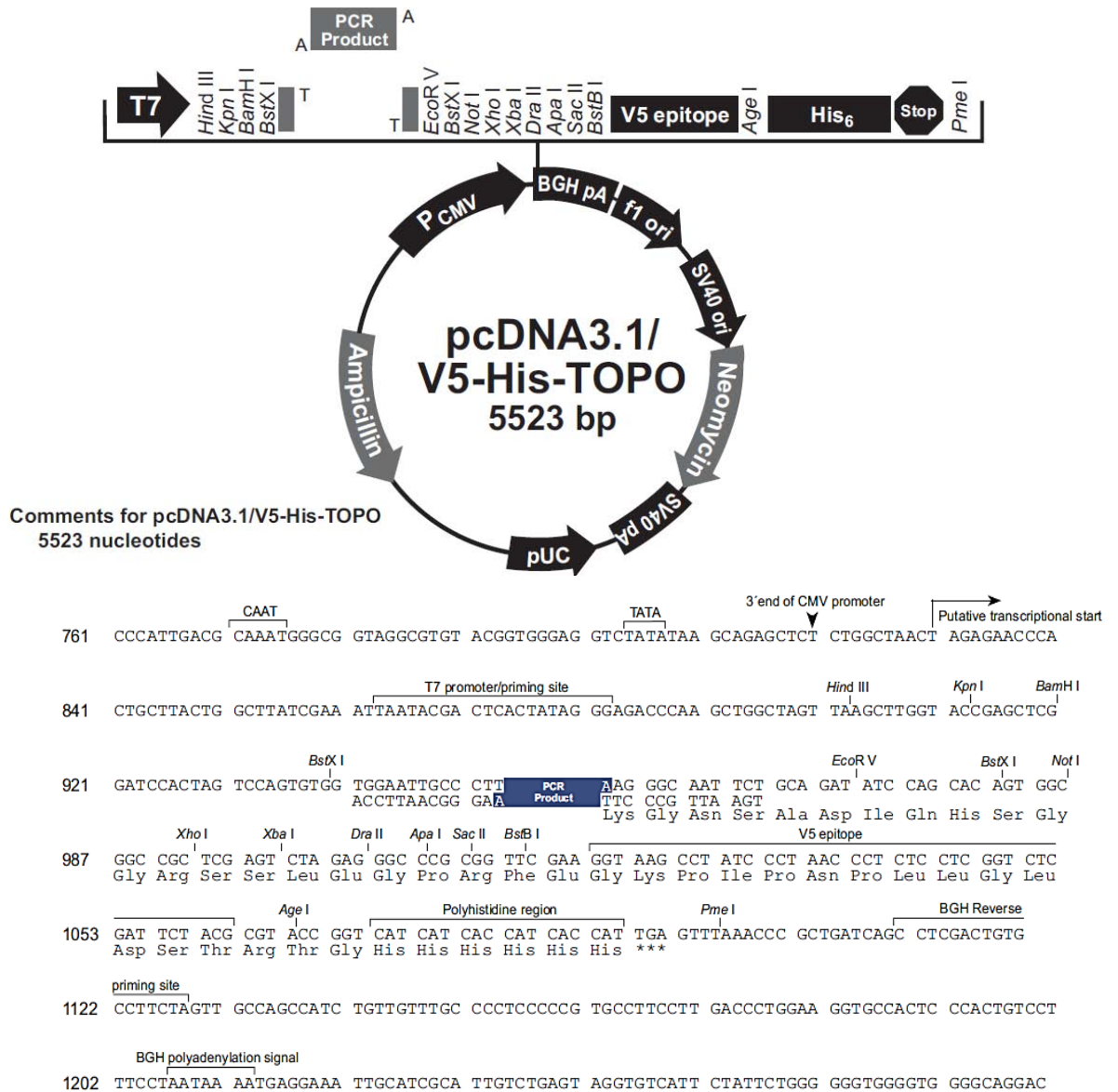
Buffer TAE 50X

Se pesan 242 g de Tris Base y se disuelven en 800 mL agua destilada se añaden 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL 0.5 M EDTA (pH=8), ajustando la solución a un volumen final de 1L.

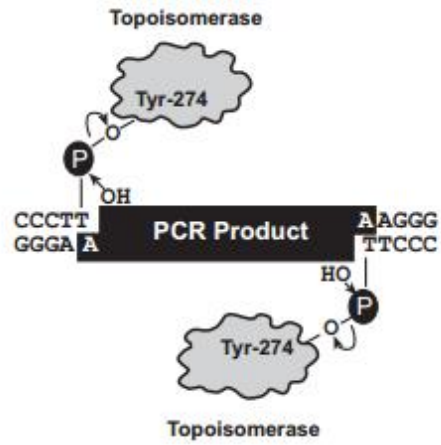
ANEXO 2. Vector de expresión

Vector de expresión

El vector pcDNA 3.1/ V5-His TOPO, es un vector altamente eficiente para la inserción de productos de PCR en un solo paso. Tiene un promotor de CMV (Citomegalovirus), para niveles elevados de expresión. Un epítipo de V5 en la porción C-terminal, para la detección eficiente de proteínas recombinantes y una secuencia de polihistidina (6xHis) en la porción C-terminal.



Mapa y sitios de restricción del vector de expresión pcDNA 3.1/ V5-His TOPO (Invitrogen).



Esquema de la reacción de ligación de los productos de PCR en el vector de expresión.