



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EL PAPEL DE LA CINASA INDUCTORA DE NF- κ B (NIK) EN LA
REGULACIÓN DE LA MULTIRESISTENCIA EN LA LÍNEA
CELULAR MCF-7**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

HERNÁNDEZ DE CASTILLA DANIEL DAMIÁN

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

ASESOR INTERNO:

M. CARLOS BAUTISTA REYES



Marzo 2016

Ciudad de México



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.

Reconocimiento

El presente trabajo de Tesis se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en el departamento de Epigenética bajo la dirección de la Dra. en C. Karla Itzel Vázquez Santillán.

Se reconoce la asesoría interna por parte del M en C. Carlos Bautista Reyes de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Reconocimiento especial a los sinodales

La Dra. María Del Carmen García Rodríguez

El Dr. Hugo López Muños

El M en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez



Agradecimientos

Primeramente a **Jehová Dios** porque de él es toda honra y gloria.

Si bien, este trabajo de investigación es el resultado del esfuerzo emprendido hace un par de años, la realización del mismo no hubiera sido posible de no ser por el apoyo de una gran cantidad de personas que me brindaron su ayuda, consejo y soporte en diferentes momentos. Por ello, dedico este espacio para dar gracias todos ellos.

A mis padres, Reyna Josefina De Castilla Ramírez y Celso Hernández Lucas, quienes incondicionalmente han creído en mí y me han apoyado incluso cuando mis decisiones no son las mejores.

A mis hermanos, Ricardo Daniel Hernández De Castilla y Marcos Eduardo Hernández De Castilla, quienes me han ayudado en momentos cruciales de mi vida con sugerencias o comentarios.

A mis abuelos, tíos, tías, primos porque en ellos he encontrado consejo, orientación y apoyo invaluable los últimos años.

A la Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán, a quién agradezco sinceramente la oportunidad que me brindo, así como su apoyo, paciencia y orientación durante cada día de la estancia en el instituto y aún después de ésta. Pero sobretodo porque es parte fundamental en mi formación.

Así mismo, agradezco a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, líder del equipo de trabajo, por haberme abierto las puertas y haberme brindado una invaluable orientación en momentos difíciles. También aprovecho para agradecer a Laura Muños, Luis Enrique, Gustavo, Mary José, Edwin, Edna, Claudia, Gabriela, Erika Reus, Eugenio, Ameyali, y a los demás integrantes del laboratorio por una increíble y memorable experiencia.

Y finalmente, a mis amigos y maestros de la facultad, institutos e iglesia.

Índice

Í RESUMEN	1
I) Introducción	3
Mortalidad del cáncer de mama.....	4
La estructura de la mama	5
Clasificación histopatológica del cáncer de mama	6
Clasificación molecular del cáncer de mama	8
Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer de mama	11
Terapias contra los subtipos luminales (terapia endocrina).....	12
Terapia contra los subtipos ErbB2-OE (Anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosinas cinasas).....	13
Terapias para los subtipos triple negativo (antineoplásicos inespecíficos)	14
Etopósido.....	14
Antraciclinas	15
Taxanes.....	15
Agentes de platino	15
Tasas de respuesta clínica	16
NF-κB.....	18
II) Antecedentes	20
Activación de NF-κB en mama	21
Vía no canónica	22
III) Justificación	24
IV Hipótesis	25
V) Objetivos.....	25
VI) Material y método	26
VII) Resultados.....	29
VIII) Discusión	35
IX) Conclusión.....	37
X) Referencias bibliográficas.....	38

Í RESUMEN

Actualmente, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina a nivel mundial. Aunque existe un amplio espectro de agentes quimioterapéuticos utilizados contra este mal, la efectividad de los mismos se ve limitada por la presencia de diferentes mecanismos de multiresistencia. NF- κ B es una familia de factores de transcripción que ha sido ampliamente reportada en numerosos tipos de cáncer, y se ha vinculado a diversos procesos de la biología del cáncer, incluyendo el fenómeno de la quimiorresistencia. Existen dos vías de activación de NF- κ B: la vía canónica y la vía no canónica. La vía canónica se caracteriza porque su activación depende de la degradación de los represores de la familia I κ B a través de IKK β , dejando libres a los dímeros transcripcionalmente activos p50/p65. Por su parte, la activación de la vía no canónica depende del procesamiento de p100 a p52 a través de la activación de IKK α , dejando libres a los dímeros p52/RelB. Recientemente, en cáncer de mama, se ha reportado que NIK, activador de la vía no canónica, se encuentra expresado constitutivamente en subtipos de cáncer de mama asociados a un fenotipo altamente agresivo y resistente a diversos tratamientos quimioterapéuticos.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo se enfocó en probar el papel de NIK en la quimioresistencia contra paclitaxel, doxorubicina, etopósido y cisplatino. Para tal fin, se generaron sublíneas celulares de MCF-7 que sobreexpresaron establemente a NIK o en su defecto que lo depletaran vía shRNA. En nuestro modelo experimental, determinamos la IC50 a 48 horas de cada fármaco en la línea parental MCF-7 y después se evaluó en cada condición.

Los datos obtenidos, revelan que la expresión de NIK aparentemente no está relacionada con la resistencia a los fármacos utilizados en el presente estudio, por lo cual, sugerimos explorar otros enfoques experimentales como el

emplear tiempos de exposición más largos, utilizar ensayos clonogénicos o explorar la resistencia en diferentes subpoblaciones dentro de la línea celular para observar si existe un efecto diferencial a la resistencia y si este está relacionado con la expresión de NIK.

I) Introducción

Desde el 2006, el cáncer de mama se convirtió en la neoplasia maligna con mayor mortalidad en la población femenina mayor a 25 años. De acuerdo con las últimas estimaciones de la organización mundial de la salud (OMS), tan solo en el año 2012 había 6.3 millones de mujeres diagnosticadas con esta enfermedad, de las cuales 1.7 millones fueron nuevos casos. La mayor incidencia de cáncer de mama se observa en países con mayor desarrollo económico. Por ejemplo, en los países más desarrollados de Europa del este, la incidencia es de ~90 casos por cada 100 000 habitantes, mientras que en los países menos desarrollados de África del oeste, la incidencia es de ~30 casos por cada 100 000 habitantes (WHO, 2015). En México, la media nacional de incidencia de cáncer de mama es de ~15 casos por cada 100 000 habitantes, sin embargo, en estados del norte y centro del país (con mayor desarrollo económico) como Coahuila y el Distrito Federal la incidencia alcanza cifras tan altas como los 17 y 18 casos por cada 100 000 habitantes respectivamente (Figura 1). Por otra parte, en estados del sur (económicamente marginados) como Chiapas y Quintana Roo la incidencia presenta cifras tan bajas como 1.5 casos por cada 100 000 habitantes (Chávarri-Guerra *et al*, 2012).

Dentro de los grupos de edad más afectados, se pueden distinguir tres grupos principales. En primer lugar, se encuentran mujeres de 60 a 64 años de edad con una incidencia de 67 casos por cada 100 000 habitantes; en segundo lugar, se encuentran mujeres de 50 a 59 años de edad con una incidencia de 53 casos por cada 100 000 habitantes; y finalmente, en tercer lugar, se encuentra mujeres de 45 a 49 años con una incidencia de 46 nuevos casos por cada 100 000 habitantes (INEGI, 2015).

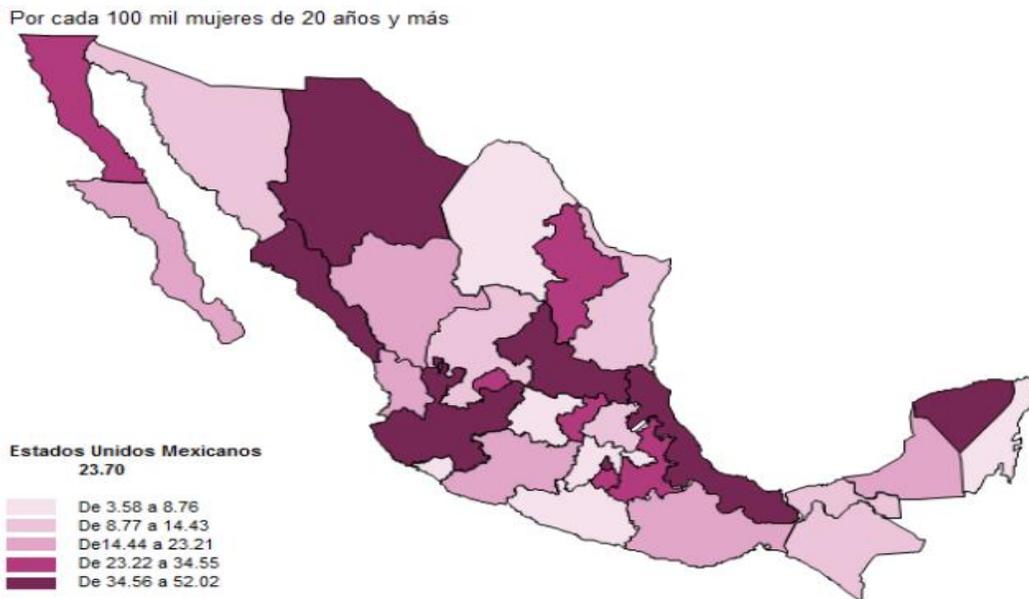


Figura 1. Distribución de la incidencia de cáncer de mama en México (INEGI 2015)

Mortalidad del cáncer de mama

En 2012, el cáncer de mama alcanzó los ~522 000 decesos, cifra 14% mayor con respecto al 2008, y según estimaciones de la OMS, se espera que esta tendencia continúe al estimarse que en el año 2020 las muertes causadas por este mal ascenderán a ~622 000 (WHO, 2015).

Ante esta situación, un gran número de países, han implementado una serie de programas de detección temprana que permitan mejorar el pronóstico de las pacientes que incluyen la exploración física, el ultrasonido y el uso de mamografías con el fin de disminuir la tasa de mortalidad (Yip *et al*, 2008).

En México, los lineamientos actuales para disminuir la mortalidad del cáncer de mama se centran en la realización de un examen clínico completo a

todas las mujeres mayores de 25 años, una mamografía bianual para mujeres de 40-49 años y una mamografía anual para mujeres mayores de 50 años (Standard NOM-041-SSA2-2011). No obstante, la cobertura del sistema nacional de salud es tan solo ~45% de la población (Knaul *et al*, 2008), lo que en términos reales significa que solamente ~19% de mujeres del grupo de riesgo de 49 a 69 años tuvieron acceso a una mamografía en 2010 (Chávarri-Guerra *et al*, 2012) y que 9 de cada 10 casos de cáncer de mama detectados en el país se encuentren en estadios avanzados (Knaul *et al*, 2008).

La estructura de la mama

La mama está constituida por tejido glandular y tejido de soporte. El primero está constituido por estructuras glandulares denominadas ductos y lóbulos, mientras que el segundo se encuentra constituido por tejido adiposo y fibrovascular (Jesinger, 2014). Sin embargo, la mayoría de las neoplasias en mama son de origen glandular (Allred *et al*, 2001).

Los ductos se encuentran organizados en una estructura conformada por una red de ~20 ductos, los cuales conectan a los lóbulos con el retículo aereolar. Los lóbulos, por otra parte, se encuentran en los extremos opuestos al retículo aureolar donde forman estructuras llamadas Unidades Lobulares-Ductales Terminales (ULDT), las cuales a su vez están constituidas por estructuras glandulares más pequeñas denominadas acini (Figura 2) (Guinebretière *et al*, 2005).

En ambas estructuras glandulares, ductos y lóbulos, se encuentran dos capas epiteliales fácilmente reconocibles. En la parte más externa, se encuentra una capa de células mioepiteliales, mientras que en la parte más interna, se encuentra una capa de células epiteliales (Jesinger, 2014). Esta última es de especial relevancia, ya que la mayoría de las lesiones malignas tienen lugar en la capa epitelial del tejido glandular (Dimri *et al*, 2005; Molyneux *et al*, 2010).

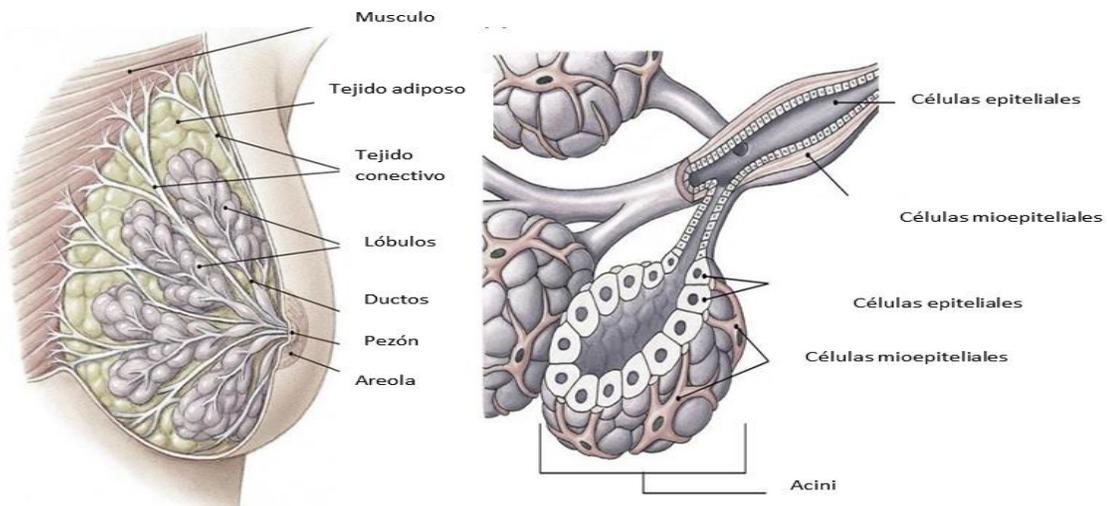


Figura 2. Representación esquemática de la disposición de las estructuras glandulares en mama. Modificado de <http://www.austincc.edu/apreview/NursingPics/ReproPics/Picture23.jpg>

Clasificación histopatológica del cáncer de mama

De acuerdo a las características histopatológicas que exhiben las lesiones encontradas en mama, éstas pueden ser clasificadas en más de 70 tipos, incluyendo lesiones malignas y benignas (Ellis *et al*, 2003). Sin embargo, por su alta incidencia, el carcinoma ductal *in situ* (CDI) y el carcinoma lobular *in situ* (CLI) son consideradas como las lesiones premalignas más comunes (Allred *et al*, 2001). Histológicamente, el CDI consiste en la acumulación de células de apariencia maligna en el lumen de los ductos mamarios, mientras que el CLI consiste en la acumulación de células de apariencia maligna en los lóbulos mamarios (Figura 3) (Burstein *et al*, 2004). Aunque el CLI y el CDI se caracterizan por una proliferación anormal y su incapacidad de invadir tejido

adyacente, una vez que el CDI y el CLI progresan e invaden el tejido adyacente se les denomina como carcinoma ductal invasivo no específico (CDINE) indistintamente de su origen (CDI o CLI) (Ellis *et al*, 2003). De hecho, el CDINE es la lesión maligna de mayor incidencia en la clínica con hasta el 75 % de los casos diagnosticado de cáncer de mama (Yerushalmi *et al*, 2009). Esta clasificación histopatológica es importante en la exploración inicial, sin embargo, resulta insuficiente para proveer información en cuanto a las tasas de respuesta a tratamientos antineoplásicos y tasas de respuesta clínica como la supervivencia general y el riesgo de recurrencia. Por ello, actualmente la clasificación del cáncer de mama se basa en los diferentes perfiles de expresión génica o en la presencia/ausencia de diferentes receptores hormonales en cada lesión.

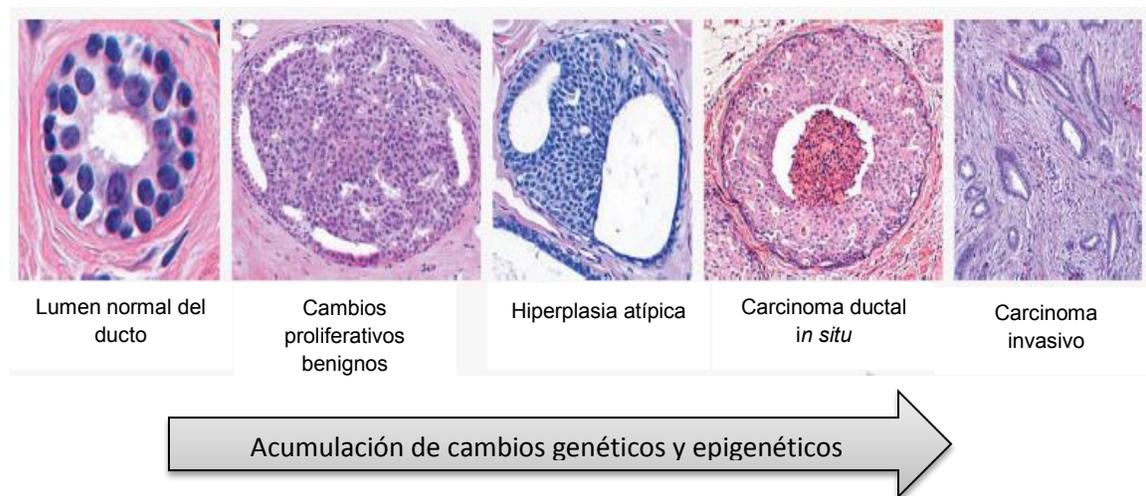


Figura 3. Representación esquemática del carcinoma ductal invasivo (CDI) Modificado de *Burstein et al*, 2004

Clasificación molecular del cáncer de mama

En la década pasada, el uso de nuevas tecnologías –microarreglos de ADNc-, permitió estudiar los perfiles de expresión génica de un gran número de biopsias malignas de mama, revelando que prácticamente cualquier lesión pueden ser clasificada de acuerdo a su perfil de expresión génica en uno de seis subtipos moleculares (Figura 4) (Prat y Perou, 2011).

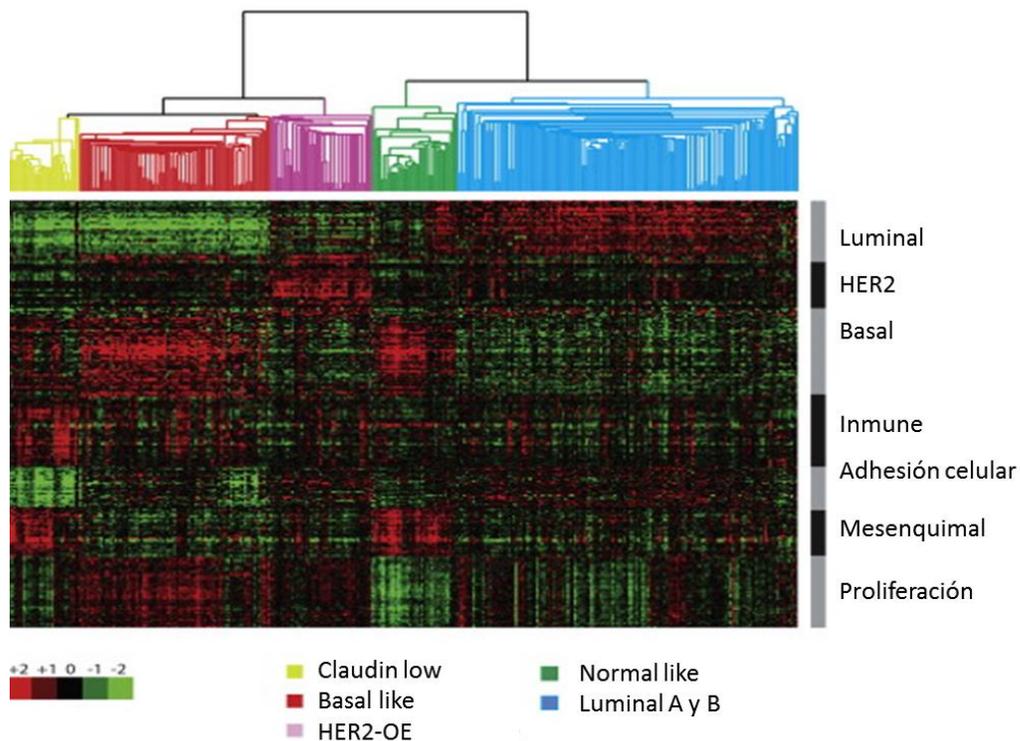


Figura 4. Esquema que muestra la clasificación molecular de los subtipos moleculares en mama modificado de Prat y Perou, 2011.

Hasta el momento, la clasificación molecular reconoce a los subtipos moleculares basal-like, caracterizados por la expresión de genes característicos de las células basales de la mama como citoqueratinas 6 y 17 (Perou *et al*, 2000); los subtipos ErBb2-overexpressing (ErBb-OE), caracterizados por

presentar la amplificación del brazo corto del cromosoma 17, el cual contiene, entre otros genes, al receptor de crecimiento epidermal 2 (HER-2) (Perou *et al*, 2000); los subtipos luminales A y B que se caracterizan por la expresión de genes relacionados a la activación del receptor de estrógenos α , de manera similar que las células luminales de mama (Sørli *et al*, 2001); los subtipos claudin-low, que se caracterizan por la baja expresión de genes involucrados en la adhesión celular y la sobreexpresión de genes relacionados con la regulación inmunológica (Herschkowitz *et al*, 2007); y finalmente, los subtipos normal like (Sørli *et al*, 2001).

A diferencia de la clasificación histológica, la calificación molecular permitió discernir diferentes pronósticos y tasas de respuesta clínica asociadas a cada subtipo molecular mejorando el pronóstico de cada paciente (Sørli *et al*, 2001). Sin embargo, debido a las implicaciones económicas que conlleva la realización de microarreglos de ADNc, en la clínica, usualmente son utilizados diferentes paneles de marcadores inmunohistológicos como un sustituto. De esta manera, los subtipos luminales se asocian a un fenotipo ER+/ERBB2-; los subtipos ErbB-2-OE, con fenotipo ERBB2+/ER-; y finalmente a los subtipos triple negativo, con el fenotipo PR-/ER-/ERBB2- (Figura5) (Sotiriou y Lajos, 2009).

Interesantemente, estos marcadores inmunohistológicos, además de ofrecer una alternativa económica de acceder a los subtipos moleculares, también permiten establecer la presencia o ausencia de posibles blancos terapéuticos como receptor de estrógenos y factor de crecimiento epidermal 2, y por ende, ayudar a identificar y mejorar el pronóstico de cada paciente (Lips *et al*, 2013).

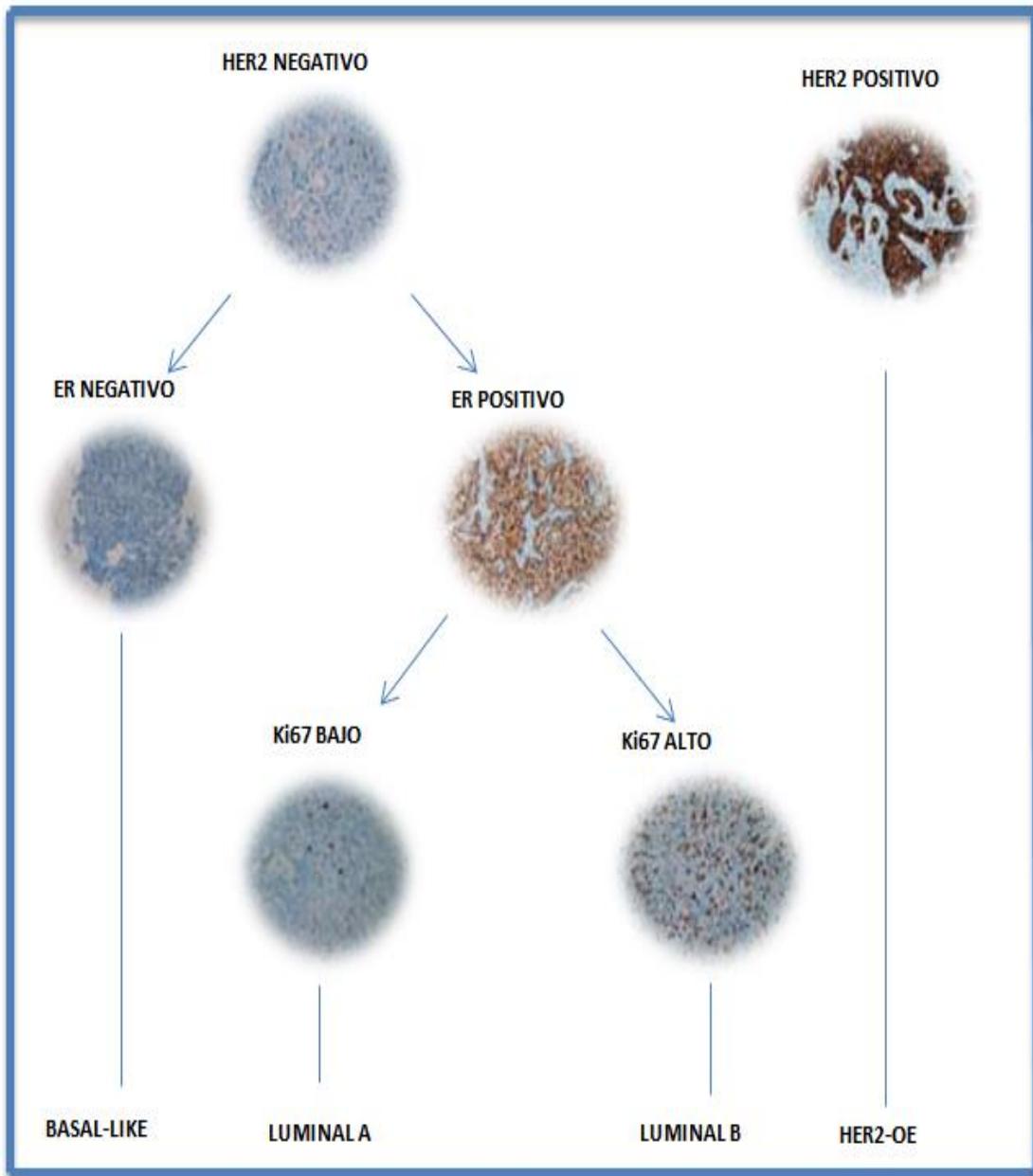


Figura 5. Representación esquemática de la clasificación molecular de cáncer de mama basada en la expresión inmunohistológica de ER/PR/HER-2/Ki67/. Modificado de Sotiriou y Lajos , 2009

J7S3DN

Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer de mama

El mejor tratamiento contra una neoplasia sólida es la resección, sin embargo, esta no siempre es posible por la ubicación del tumor o porque el tumor se encuentra en estadios avanzados. En los casos en que el tumor se encuentra localmente avanzado es posible la administración de un régimen quimioterapéutico neoadjuvante con la finalidad de disminuir el tamaño de la lesión y permitir así su resección. No obstante, en los casos en que el tumor no puede ser operado por su ubicación, el régimen neoadjuvante se utiliza como único tratamiento (Honig *et al* , 2005). Por otro lado, cuando la resección es posible, se administra un régimen quimioterapéutico adyuvante posterior a la cirugía, cuya función es evitar la siembra de nuevos tumores (Chew, 2001).

Es importante señalar que a pesar de que los regímenes neoadjuvantes o adjuvantes pueden incluir un solo agente antineoplásico o usar varias combinaciones en conjunto, la elección de los agentes antineoplásicos depende de las características únicas de cada paciente.

Actualmente, la elección de los regímenes quimioterapéuticos depende principalmente del subtipo molecular. Por ejemplo, para los subtipos ER+ la principal línea de tratamiento es la terapia endocrina (Davies *et al*, 2013); para los subtipos ErbB-2-OE son empleados agentes dirigidos contra la activación del receptor HER-2 (Schroeder, *et al* 2014); mientras que para los subtipos ER-/ERBB2-/PR-, que incluyen a los subtipos basal-like y claudin-low, son utilizados antineoplásicos inespecíficos, ya que estos subtipos carecen de dianas moleculares (Honig *et al*, 2005; Joensuu y Gligorov, 2012).

Terapias contra los subtipos luminales (terapia endocrina)

Como se mencionó previamente, los subtipos luminales se caracterizan por expresar el receptor de estrógenos α . Este receptor se encuentra anclado en la membrana plasmática de las células que lo expresan y es activado tras su unión con 17β estradiol, su ligando. Una vez activo, el receptor de estrógenos se trasloca al núcleo en donde se une a secuencias de ADN genómico conocidas como elementos responsivos de estrógeno, favoreciendo el reclutamiento de proteínas coactivadoras y la ARN polimerasa II, lo que promueve la actividad transcripcional de sus genes diana (Marino *et al*, 2006).

El receptor ER α participa en la proliferación celular (Cheng *et al*, 2004; Tan *et al*, 2009), el proceso de transformación (Tilli *et al*, 2003; Frech *et al*, 2005), el fenómeno de invasividad (Oviedo *et al*, 2011) y la evasión de la muerte celular programada (Brendel *et al*, 2013).

Teniendo en cuenta estos factores, se han explorado diferentes enfoques quimioterapéuticos dirigidos a inhibir la activación de ER α con agentes quimioterapéuticos que incluyen moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), reguladores río abajo del receptor de estrógenos (SERD) e inhibidores de aromatasas (AI) (Johnston, 2005).

Los SERM, como el Tamoxifem, funcionan al competir con 17β estradiol por la unión al ER, evitando de esta manera su activación (Wardell *et al*, 2014). Por otra parte, los SERD, como el Fulvestran, se unen al ER α , inhibiendo su translocación nuclear y favoreciendo su degradación proteosomal, con lo que también reduce la disponibilidad del ER α (Osborne *et al*, 2004). Finalmente, los AI, como el Anastrozole, se unen a la enzima aromatasas, evitando que esta pueda producir E2 *de novo*, lo que limita la disponibilidad de 17β estradiol, y por ende la activación del ER α (Fabian, 2007).

Terapia contra los subtipos ErbB2-OE (Anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosinas cinasas)

Las lesiones ErbB-2-OE, se caracterizan por la sobreexpresión del receptor de crecimiento epidermal 2 (HER-2). El receptor HER-2 pertenece a la familia de receptores de crecimiento epidermal (EGFR), los cuales exhiben actividad tirosina cinasa (Bazley y Gullick, 2005). La correcta regulación de esta familia de receptores se encuentra implicada en la apropiada organogénesis del cerebro, corazón, piel y pulmones, sin embargo, la alteración en la regulación de estos receptores se ha relacionado con el cáncer (Wieduwilt y Moasser, 2008).

La familia EGFR incluye a los receptores ErbB1, ErbB2 (HER-2), ErbB3 y ErbB4. Estructuralmente, estos receptores son una glicoproteína transmembranal de una cadena simple que se compone de un dominio tirosina cinasa que reside dentro del citoplasma, un dominio transmembranal y un dominio extracelular de unión a ligando. En su forma inactiva, estos receptores se encuentran en forma de monómeros a lo largo de la membrana citoplasmática. La activación de la familia EGFR se lleva a cabo tras la unión a su ligando en una configuración 1:1 del receptor/ligando, la cual es precedida por la homo- o heterodimerización secuencial de estos receptores y culmina en la fosforilación del dominio intracelular y la transducción a través de mensajeros intracelulares o directamente a través de la translocación de este receptor en el núcleo (Wieduwilt y Moasser, 2008). El rol de HER-2 en la biología del cáncer es indudable desde que éste ha sido vinculado a diversos procesos carcinogénicos en neoplasias de próstata ovario, pulmón y mama (Yan *et al*, 2015). En este último, se ha relacionado con la proceso de transformación celular, la proliferación celular, evasión de la apoptosis y la angiogénesis (Moasser, 2007; Angelini *et al*, 2013; Arman *et al*, 2014).

Existen dos enfoques terapéuticos utilizados para tratar las lesiones ErbB-2-OE. El primero consiste en el uso de anticuerpos monoclonales contra este

receptor, lo que evita su dimerización y, a su vez, los anticuerpos marcan a estas células mediante opsonización para su posterior eliminación por el sistema inmune (Vu y Claret, 2012). Por otra parte, el segundo método consiste en el uso de inhibidores de cinasa que evitan que este receptor pueda llevar a cabo la señalización río abajo tras su activación (Schroeder *et al*, 2014).

Terapias para los subtipos triple negativo (antineoplásicos inespecíficos)

Las lesiones conocidas como triples negativo, es decir, los subtipos basal-like y claudin-low, al no expresar ER α y ERBB2, no se benefician de las terapias endocrinas ni tampoco de terapias dirigidas contra la activación de ERBB2. Por ello, para su tratamiento, se utilizan diferentes combinaciones de agentes quimioterapéuticos acorde a la naturaleza de cada paciente. Dichas terapias incluyen antraciclinas, taxanes, agentes de platino y etopósido. (Hudis y Gianni, 2011; Peng *et al*, 2012; Minckwitz y Martin, 2012).

Etopósido

Etopósido o VP-16 es un derivado de podofaloidina y, al igual que esta toxina, es capaz de inhibir el ensamble de los microtúbulos durante la metafase. Sin embargo, el principal mecanismo de acción de etopósido en la concentración plasmática utilizada es a través de dañar la acción de la topoisomerasa II. La topoisomerasa II actúa al unirse covalentemente al ADN para formar un complejo denominado complejo de escisión, el cual puede trasladar una doble cadena de ADN a través de una ruptura reversible para liberar la tensión originada por el superenrollamiento. Tras la unión de etopósido con la topoisomerasa II, la unión del ADN con la topoisomerasa es estabilizada, lo que evita que las escisiones al ADN se puedan reparar, llevando a la muerte celular (Hainsworth y Greco, 1995).

Antraciclinas

Doxorrubicina, al igual que otros miembros de la familia de las antraciclinas, proviene del producto de fermentación de *Streptomyces paucetus*. doxorubicina, de manera similar a etopósido, funciona como un potente inhibidor de la topoisomerasa II, sin embargo, el principal mecanismo de acción que se le atribuye a doxorubicina es la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Thorn *et al*, 2012).

Taxanes

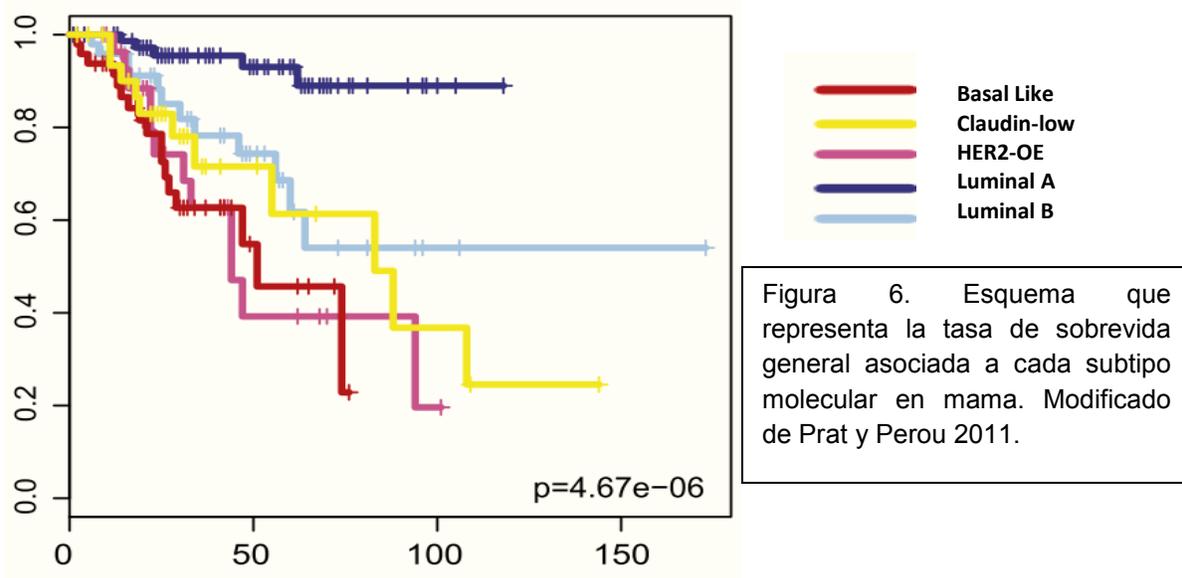
El taxol es un agente antineoplásico que actúa principalmente sobre células altamente replicativas. Este fármaco actúa sobre las células en replicación al estabilizar el ensamblaje de los microtúbulos a través de su capacidad de mediar la unión de las subunidades de β tubulina con las subunidades α tubulina de manera irreversible. Esta propiedad del taxol es especialmente útil al dañar la función de los centriolos y la formación de los ejes mitóticos, llevando a la célula a la detención del ciclo celular y posterior apoptosis (Abal *et al*, 2003).

Agentes de platino

Cisplatino, al igual que otros agentes de platino (oxalapatino y carboplatino), actúa principalmente a nivel de ADN. Principalmente, cisplatino actúa formando las lesiones 1,2 intracadena ApG y GpG. Dichas lesiones son reconocidas por los mecanismos de reparación de ADN, por el factor de unión río arriba de la ARN polimerasa humana 1 (hUBF) y el factor de transcripción a la caja TATA (TBP) y se unen a estas lesiones evitando su correcta reparación llevando al arresto del ciclo celular y posteriormente a la apoptosis (Siddik, 2003).

Tasas de respuesta clínica

A partir del descubrimiento de los diferentes subtipos moleculares en cáncer mama, han surgido diferentes estudios que han explorado la relación entre estos subtipos y la respuesta clínica que exhiben ante diferentes fármacos antineoplásicos. En dichos reportes, la relación que cada subtipo molecular exhibe con respecto a las tasas de respuesta patológica completa (pCR), la tasa de supervivencia general (OS) y la tasa de (RR) riesgo de recurrencia, es única para cada subtipo molecular (Figura 6).



Es interesante, por ejemplo, notar que la tasa de pCR es casi constante en cada subtipo molecular independientemente del fármaco utilizado (Prat y Perou 2011). En este sentido, podemos observar que los subtipos basal like y ErbB-2-OE son más sensibles a los regímenes quimioterapéuticos al alcanzar pCR de 45%, mientras que en los subtipos luminales la tasa de pCR es de apenas 6% (Rouzier *et al*, 2005).

En adición, también existe evidencia que sugiere que independientemente del subtipo molecular, una vez que la pCR es alcanzada el pronóstico de los pacientes mejora al disminuir el RR y aumentar la OS (Carey *et al*, 2007).

Por otra parte, la OS nos permite estudiar el comportamiento que tiene cada subtipo molecular durante la historia natural de la enfermedad, y al igual que la pCR, la OS sugiere el pronóstico de sobrevida depende exclusivamente del subtipo molecular independientemente del fármaco utilizado (Desmedt *et al*, 2008; Kao *et al*, 2011).

De manera inversa a las tasas de pCR, las tasas de OS a 10 años sugieren que los mejores pronósticos los presentan los subtipos luminal A al tener una OS de ~ 90%, sin embargo, este comportamiento no es extensivo al subtipo luminal B, ya que para estos la OS es de ~ 50% (Sørлие *et al*, 2001; Carey *et al*, 2007); por otro lado, en el otro extremo de la balanza, se encuentran las lesiones ErbB-2-OE y triple negativo, que a pesar que inicialmente alcanzan mejores tasas de pCR, las tasas de mortalidad de ambas cercanas al 80% (Sørлие *et al*, 2001). Sin embargo, en los subtipos basales, estudios recientes sugieren que existen dos poblaciones diferenciadas por sus pronósticos. Un subconjunto del 60% cuya sobrevida es mayor a 10 años y un subconjunto del 40%, cuya sobrevida general es inferior a 5 años (Hallett *et al*, 2012).

En este punto, podemos establecer que si bien el cáncer de mama es la neoplasia con mayor decesos, en realidad no todos los subtipos de cáncer de mama tienen el mismo comportamiento clínico, de hecho, de todos los subtipos moleculares, el subtipo basal-like representa el peor pronóstico debido a que, además de carecer de blancos moleculares, exhibe una de las mayores tasas de resistencia o multirresistencia que se ve reflejado en su altos índices de RR. Por lo que elucidar a los mecanismos de resistencia y su regulación se convierte en una prioridad.

NF-κB

La familia de NF-κB, o Nuclear Factor κappa de células B, es una familia de factores de transcripción que participa en diversos procesos biológicos como la respuesta inmune, la proliferación celular, el desarrollo embrionario y la muerte celular programada (Karin y Lin, 2008). En mamíferos, la familia de NF-κB está constituida por los miembros NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA, c-Rel y RelB. Estructuralmente, éstos están relacionados al compartir el dominio homologo Rel (RHD), responsable por la dimerización de los miembros de esta familia y su posterior unión a las secuencias genómicas κB. Sin embargo, solo los dímeros que contienen a las subunidades p65, c-Rel y RelB son capaces de regular positivamente la transcripción. Esto debido a que poseen el dominio de activación de transcripción (TAD) (Hayden y Ghosh, 2008). En su forma inactiva, los dímeros de NF-κB se encuentran secuestrados en el citoplasma al estar asociados con proteínas represoras de la familia IκB (IκBα, IκBβ, IκBξ, IκBγ, BCL3) o a las proteínas precursoras p100 y p105 (las cuales funcionan como represoras al compartir un motivo IκB en el C-terminal). Esta asociación enmascara la secuencia de localización nuclear (NLS) de los dímeros de NF-κB y evita su importación al núcleo (Huxford *et al*, 1998). Por ello, la activación de la vía de NF-κB depende de la degradación de los represores IκB en la vía canónica o el procesamiento del precursor p100 en la vía no canónica.

En ambas vías de activación de NF-κB, la degradación de los represores IκB y el procesamiento de p100 están mediados por los miembros del complejo heterodimerico IKK. El complejo IKK, o cinasa IκB, está conformado por las unidades catalíticas con actividad cinasa IKKα (IKK1/CHUCK) e IKKβ (IKK2/IκBKB), además de la unidad reguladora IKKγ (NEMO/modulador esencial de NF-KB (Hayden y Ghosh, 2008).

En la vía canónica, la degradación de los represores IκB esta mediada por la el complejo IKK mediante la subunidad reguladora NEMO y la subunidad

catalítica IKK β . Esta última se encarga de fosforilar al represor I κ B α en los residuos de serina 32 y 36, y al represor I κ B β en los residuos de serina 19 y 23 (Hayden y Ghosh, 2008). Una vez fosforilados estos miembros de la familia de I κ B, los complejos ubiquitin ligasa E3 (SCP $^{\beta$ TrCP) y ubiquitin ligasa E2 (UbcH5), añaden cadenas de ubiquitina k48 a los miembros de I κ B para que sean reconocidos y degradados por 26s. De esta manera, los dímeros transcripcionalmente activos p65/p50 son liberados para internalizarse al núcleo y posteriormente unirse a las secuencias κ B de ADN genómico (Sun, 2011).

Por otro lado, en la vía no canónica, el procesamiento del precursor p100 depende exclusivamente de la subunidad catalítica IKK α , la cual, al ser activada, fosforila a p100 en el C-terminal sobre los residuos de serina 865, 869 y 871 (Hayden y Ghosh, 2008). Dicha fosforilación es reconocida como un sitio de unión del complejo ubiquitin ligasa E3 *ScF $^{\beta$ TrCP*, el cual ubiquitina a p100 sobre el residuo lys856 que se encuentra adyacente al motivo I κ B (Sun, 2011). Una vez marcada esta región I κ B, es reconocida y escindida por el proteosoma, dejando libre a los dímeros transcripcionalmente activos p52/RelB (Xiao *et al*, 2001).

Es importante señalar que si bien la activación de ambas vías de NF- κ B dependen de la activación del complejo IKK, río arriba de la vía canónica, se encuentran acopladas la familia de “Proteínas Interactivas de Receptor” (RIP) y a la familia “Factor Asociado al Receptor INF” (TRAF), mientras que en la vía no canónica la activación del complejo IKK solo depende de esta última (Hayden y Ghosh, 2008).

En la vía canónica, la activación del complejo IKK depende de las ubiquitin ligasas TRAF2, TRAF5 y TRAF6 que en conjunto con la familia RIP y otras proteínas accesorias activan esta vía indirectamente a través de la ubiquitinación de la subunidad reguladora NEMO o directamente al unirse sobre este (Chen, 2005). En contraste, la activación del complejo IKK en la vía no canónica esta mediada por la ubiquitin ligasa E3 T2-T3-clAP, formada por

TRAF2 y TRAF3 en conjunto con los inhibidores celulares de apoptosis 1 y 2 (cIAP1/2). En condiciones normales, el complejo T2-T3-cIAP ubiquitina a la Cinasa Inductora de NF- κ B (NIK), evitando de ésta manera que pueda fosforilar y activar a IKK α (Sun, 2011).

La importancia de la vía de NF- κ B en la biología del cáncer ha tomado particular relevancia desde que su activación se ha registrado en distintos tipos de cáncer como leucemias, linfomas, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de melanoma y cáncer de mama (Rayet y Gélinas, 1999; Jana *et al*, 2012; Lewander *et al*, 2012; W. Wang *et al*, 1999; Shukla *et al*, 2004).

II) Antecedentes

En el año 1996 Y. Wang y su equipo de trabajo demostraron que la sobreexpresión del superrepresor de NF- κ B (I κ B^{AA}), induce apoptosis en la línea celular de cáncer colorectal HT1080 al ser estimulada con TNF α , además incrementa la susceptibilidad al fármaco danourrubicin (Antraciclina) y a la radiación ionizante. Además, al sobreexpresar a las subunidades p50 y p65 en el modelo HT1080 I κ B^{AA} y estimular a las células con TNF α la apoptosis es inhibida (Wang *et al*, 1996).

Posteriormente, el papel de la activación de la vía canónica NF- κ B como mediador de la resistencia *in vivo* fue explorado por Jun Guo y su equipo de trabajo, quienes transfectaron un siARN dirigido contra p65 sobre la línea celular HCT116, la cual posteriormente fue implantada en un modelo xenográfico de ratones desnudos tratados con irinotecan (inhibidor de la topoisomerasa1). Los resultados de dicho estudio demostraron que la inhibición de NF- κ B es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral en presencia de irinotecan, lo que demostró su posible utilidad como blanco terapéutico al mediar la resistencia a Irinotecan (Guo *et al*, 2004). Adicionalmente, se demostró que la activación de NF- κ B está

vinculada con la resistencia a la radioterapia (Cao *et al*, 2009), las antraciclinas (Bednarski *et al*, 2009), el tamoxifem (deGraffenried *et al*, 2004), el etopósido (Morotti *et al*, 2006) y el cisplatino (Almeida *et al*, 2014).

Los modelos propuestos para explicar la relación entre la activación de NF- κ B en la quimioresistencia incluyen pero no se limitan a la inhibición de la apoptosis, la regulación de los mecanismos de reparación de daño al ADN (Volcic *et al*. 2011), la regulación de las bombas expulsoras de fármacos ABC (Zhou *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2011), la inhibición de las vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Chen *et al*, 1999; Hong *et al*, 2000; Deveraux *et al*, 1998), la regulación de mecanismos de reparación de daño al ADN (Harte *et al*, 2014), o a través de la regulación de la proliferación celular (Thu *et al*, 2012).

Activación de NF- κ B en mama

La relación entre la vía canónica de NF- κ B en el tejido glandular en mama fue reportada por Brantley y su equipo de trabajo, quienes trasplantaron el rudimento epitelial mamario de neonatos IK β $\alpha^{-/-}$ en modelos de ratones IK β $\alpha^{+/+}$ y siguieron el desarrollo del tejido glandular. En sus resultados, describieron que el tejido glandular desarrollado a partir del rudimento epitelial de los ratones IK β $\alpha^{+/+}$ se desarrollaba de manera normal, mientras que las estructuras glandulares desarrolladas a partir de los ratones IK β $\alpha^{-/-}$ se ramificaban excesivamente dando lugar a hiperplasias intraductales e incrementando la tasa de proliferación del tejido glandular (Brantley *et al*. 2001)

Posteriormente, Pratt y su equipo de trabajo exploraron la relación entre NF- κ B y el proceso tumorigenico en mama al expresar al superrepressor de NF- κ B, IK β α^{SR} , en ratones transgénicos y tratarlos con agentes carcinogénicos (DMBA/MPA). En dicho estudio, los ratones IK β α^{SR} incapaces de activar la vía canónica desarrollaban menos tumores luminares en presencia de agentes

carcinogénicos en comparación con ratones que expresaban la versión normal de I κ B α , sugiriendo que esta familia es necesaria para el proceso de transformación (Pratt *et al*, 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la vía canónica NF- κ B se encuentra expresada constitutivamente en una gran variedad de subtipos de cáncer de mama caracterizados por su comportamiento altamente agresivo (subtipos basales y claudin-low) (Yamamoto *et al*, 2010; Yamamoto *et al*, 2013).

Vía no canónica

De manera similar a la vía canónica de NF- κ B, la vía no canónica también ha sido reportada en un gran número de neoplasias como linfomas (Odqvist *et al*, 2013), cáncer pancreático (Wharry *et al*, 2009), cáncer de ovario (Uno *et al*, 2014), melanoma (Thu *et al*, 2012), cáncer de pulmón (Saitoh *et al*, 2010) y cáncer de mama (Yamamoto *et al*, 2010). De manera similar a la vía canónica, la vía no canónica regula la sobrevivencia celular (Odqvist *et al*, 2013), la proliferación celular (Uno *et al*, 2014), el crecimiento tumoral (Thu *et al*, 2012; Odqvist *et al*, 2013), la autorrenovación de las células iniciadoras de tumores (Zhang *et al*, 2013), la tumorigenesis (Saitoh *et al*, 2008) y la resistencia a la radioterapia (Xu *et al*, 2008). No obstante, si la vía no es capaz de regular la multirresistencia y si estos fenómenos son extensibles a otros tipos de cáncer aún permanece por ser elucidado.

Recientemente, el grupo de la Dra. Vilma Maldonado, describió que NIK se encuentra sobreexpresado en líneas de MCF-7 quimiorresistentes, seleccionadas mediante la exposición gradual a concentraciones crecientes de diferentes fármacos antineoplásicos (Figura 7). Lo que potencialmente vincula a la cinasa NIK y la vía no canónica con el fenómeno de multirresistencia en cáncer de mama (datos no publicados).

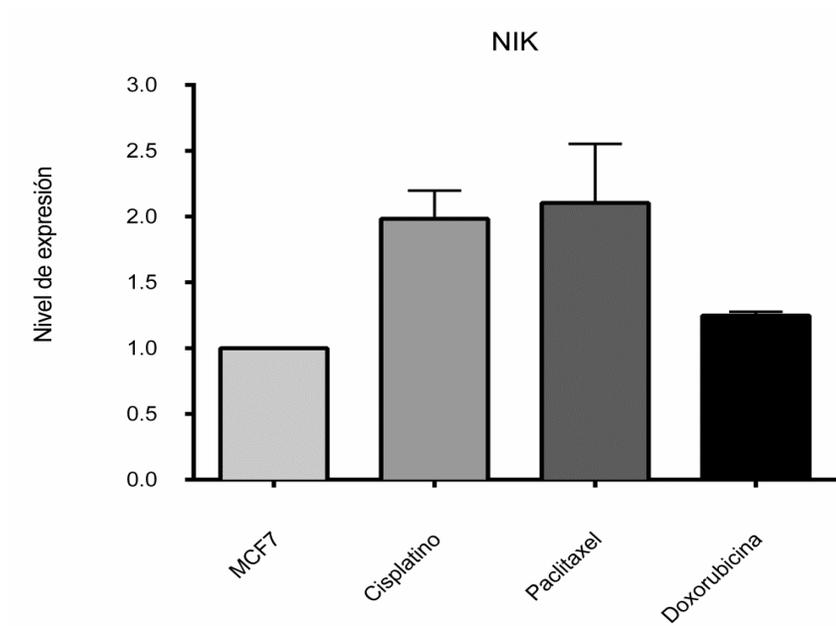


Figura 7. Representación del nivel relativo de expresión de NIK en sublíneas quimiorresistentes derivadas de MCF-7

III) Justificación

Desde el 2006, el cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en la población femenina y actualmente constituye la primera causa de muerte a nivel mundial. Aunque actualmente existen una gran cantidad de fármacos utilizados contra el cáncer de mama, la mayoría de éstos terminan perdiendo su actividad debido a la presencia de diversos mecanismos de multirresistencia.

Los fenómenos responsables por la quimiorresistencia generalmente incluyen la reparación de daño al DNA, la regulación de la apoptosis, y la expresión de bombas expulsoras de fármacos de la familia ABC. Aunque estos mecanismos de multirresistencia se han reportado como fenómenos aislados, muchos de estos convergen en la activación de NF- κ B.

Recientemente, fue reportado que la vía no canónica se encuentra constitutivamente expresada en los subtipos basal-like, los cuales están asociados a un comportamiento altamente agresivo y resistente a diversos tratamientos inespecíficos. Adicionalmente, en el laboratorio, NIK, mediador de la activación no canónica de NF- κ B, fue encontrado sobreexpresado en sublíneas MCF-7 quimiorresistentes. Sin embargo, si la vía no canónica de NF- κ B está involucrada en el fenómeno de quimiorresistencia permanece por ser elucidado. Por lo que este trabajo pretende describir el papel de NIK en la quimiorresistencia en cáncer de mama.

IV Hipótesis

Dado que la cinasa inductora de NF- κ B (NIK) se encuentra sobreexpresada *per se* en líneas de cáncer de mama quimioresistentes y en las líneas resistentes inducidas de MCF-7, suponemos que NIK es capaz de mediar la resistencia a los fármacos taxol, cisplatino, doxorubicina y etopósido.

V) Objetivos

Objetivo General

Determinar si la expresión de NIK afecta de manera diferencial la quimioresistencia a taxol, cisplatino, doxorubicina y etopósido.

Objetivos particulares

1. Establecer las condiciones del cultivo celular de la línea de cáncer de mama MCF-7.
2. Determinar la concentración inhibitoria del 50% a 48 horas de taxol, cisplatino, doxorubicina y etopósido sobre la línea parental MCF-7.
3. Realizar transfecciones estables para inhibir y sobreexpresar a NIK y probar la IC50 previamente obtenida en MCF-7 sobre éstas.

VI) Material y método

Cultivo celular

La línea celular MCF-7 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó utilizando medio EMEM (ATCC) libre de antibiótico suplementado al 10 % de suero fetal bovino (ATCC) en una atmósfera saturada de humedad, al 5 % de CO₂ a 37 °C.

Transfecciones estables

Con el fin de evaluar el efecto de NIK ante diversos fármacos antitumorales, se transfectaron las siguientes construcciones: el vector pT-Rex™-DEST30 (life technologies), en el cual fue clonado previamente el ORF de NIK, para dar lugar a la línea MCF-7 NIK-OE, y como control, se utilizó el mismo vector pero conteniendo el ORF de LACZ, en lugar del ORF de NIK, para dar lugar a la línea celular MCF-7 LACZ.

Por otra parte, para evaluar el efecto de la inhibición de NIK, se utilizó el vector Psiren-RetroQ (clontech Inc.) en el cual fue clonado la secuencia previamente un shARN de secuencia CCGAGAGTCTTGATCAGAT dirigido contra NIK para dar lugar a MCF-7 LE, mientras que para su control, se utilizó el mismo vector pero conteniendo un shARN dirigido contra la luciferasa para dar lugar a la línea celular MCF-7 LUC.

En todas las transfecciones fue utilizado Lipofectamine® 2000 (Life Technologies™) como agente transfectante siguiendo las especificaciones del proveedor. Se incubaron un millón de células MCF-7 en placas de seis pozos hasta alcanzar el 90 % de confluencia y posteriormente se transfectaron con 4000 ng de plásmido en un medio libre de suero fetal bovino.

Selección de transfecciones estables

Las células fueron seleccionadas con puromicina para los plásmidos Psiren y con G418 para pT-Rex. La concentración del antibiótico fue determinada mediante la titulación de los mismos y se determinó la concentración mínima a la cual mueren todas las células en una semana. Dicha concentración fue utilizada para seleccionar por tres semanas a las sublíneas celulares MCF-7 NIK-OE, MCF-7 LACZ, MCF-7 LUC y MCF-7- LE.

Confirmación molecular de la expresión de NIK en las sublíneas de MCF-7

El estado de expresión de NIK se evaluó por RT-PCR punto final. Para ello, se sembraron las líneas celulares MCF-7-NIK-OE, MCF-7 LACZ, MCF-7 LUC y MCF-7-NIK-LE en placas de seis pozos y al llegar al 80% de confluencia, se procedió a la extracción del ARN total utilizando el reactivo trizol (Life technologies™). Brevemente: se lisaron las células con 1ml de trizol, se incubó 15 min a temperatura ambiente, se añadió cloroformo en una relación 10:2 al lisado y se centrifugó a 12 000 x g a 4° C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se añadió isopropanol en una relación 1:1 y se centrifugó a 10 000 x g a 4°C. El botón resultante se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó a 7 500 x g. el botón resultante se llevó a sequedad y se rehidrató en 50 µl de agua libre de nucleasas.

RT-PCR punto final

La determinación del estado de NIK en las transfecciones se llevó a cabo mediante PCR punto final. Para ello, se retrotranscribieron 2 µg de ARN total utilizando el KIT máxima first strand cDNA síntesis™ (thermo scientific), y se utilizó el ADNc resultante para realizar las PCR de cada gen investigado. Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones generales para las PCR y secuencias de los primer				
Gen	Primer 5' ->3'	Primer 3' ->5'	TM	Ciclos
18s	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	TCCTCGTTCATGGGGAATAA	56	18
NIK	TTAGAAACACCCCGCAGTTC	TCCACACGTGGTTCAGACAT	56	40

Concentración inhibitoria del 50 %

Con el fin de evaluar el efecto de NIK sobre la resistencia a diversos fármacos antineoplásicos (taxol, cisplatino, etopósido y doxorubicina), se estableció la concentración inhibitoria del 50 % por el método del cristal violeta sobre la línea parental MCF-7 y posteriormente sobre las líneas celulares MCF-7-NIK-OE, MCF-7-LACZ, MCF-7-LUC y MCF-7-NIK-LE. Brevemente, se sembraron 10 000 células de cada línea celular en placas de 96 pozos, 4 pozos por concentración y 5 diferentes diluciones. Las células se cultivaron por 24 horas. Posteriormente, se sustituyó el medio de cultivo por medio de cultivo adicionado con, paclitaxel (Calbiochem), cisplatino, etopósido (Sigma Aldrich) y doxorubicina por 48 horas. Transcurrido el tiempo de exposición, se lavaron las células con 100 µl de PBS, se fijaron con 75 µl de metanol y se tiñeron con 75µl de cristal violeta al 1 %. El exceso de colorante se lavó con agua corriente. Posteriormente, el colorante se solubilizó con 100 µl de ácido acético glacial al 33 % y se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Graph Pad 6 para Windows. Los datos graficados están presentados con SD, las diferencias significativas de la IC50 se evaluaron con una prueba t de student de doble cola para datos no pareados con una P de 0.05. Mientras que para el análisis de la varianza entre las curvas de las IC50, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05.

VII) Resultados

Sobreexpresión e inhibición de NIK

Antes de proceder a los ensayos de quimiorresistencia, se comprobó la sobreexpresión en la línea MCF-7-NIK-OE con respecto a MCF-7-LACZ o la inhibición de NIK en MCF-7-NIK-LE con respecto a MCF-7-LUC, utilizando PCR punto final. Como se esperaba, la sublínea celular MCF-7-NIK-OE exhibió una mayor expresión de NIK en comparación con el control MCF-7-LAC, mientras que en la sublínea celular MCF-7-NIK-LE, la expresión de NIK disminuyó considerablemente en comparación con su control MCF-7-LUC (Figura 8).

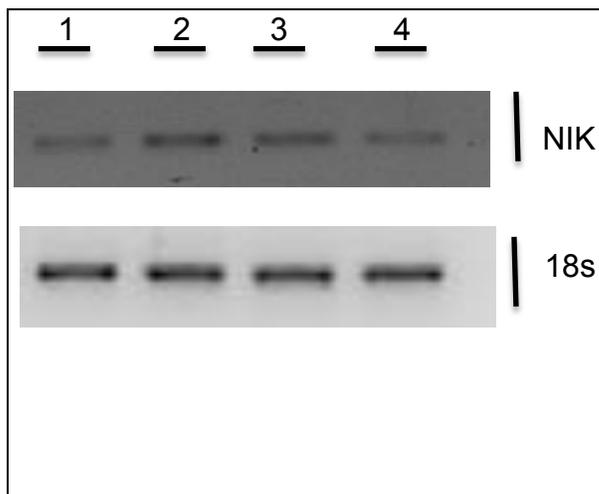


Figura 8. Carril 1 MCF-7-LAC, carril 2 MCF-7-NIK-OE, carril 3 MCF-7-LUC y carril 4 MCF-7-NIK-LE.

Citotoxicidad diferencial en MCF7

Antes de evaluar la expresión de NIK en la multirresistencia, se evaluó la quimiorresistencia de la línea parental MCF-7 ante los diferentes agentes antineoplásicos a 48 horas. En concordancia con la literatura (Liebmann *et al*, 1993), al establecer la IC50 de taxol encontramos que MCF-7 mostraba un efecto refractario al aumentar la concentración (Figura 9) por lo que posteriormente se decidió ubicar una IC50 curso temporal y se ubicó la concentración mínima a la que mantenía su efecto a las 72 horas (Figura 10). Se registró que el efecto se mantiene incluso a 15 nm, sin embargo se decidió utilizar la concentración de 30nm como la concentración mínima a la cual mantenía su efecto biológico y se buscó una IC50 dependiente del tiempo, la cual se ubicó en 48 horas (Figura 11). Para etopósido, la IC50 se ubicó en 60 μM de manera similar con Alpsy *et al*, 2014. Para doxorubicina, la IC50 fue de 2 μM para en concordancia con Tegze *et al*, 2012 . Finalmente, para cisplatino, la IC50 se ubicó en 60 μM de para Cisplatino (Figura 11).

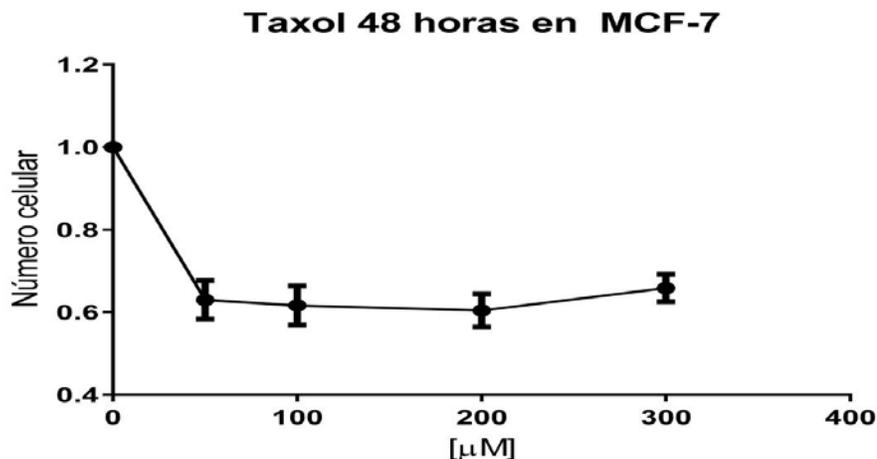


Figura 9. IC50 dosis respuesta Taxol a 48 horas

Taxol 72 horas en MCF-7

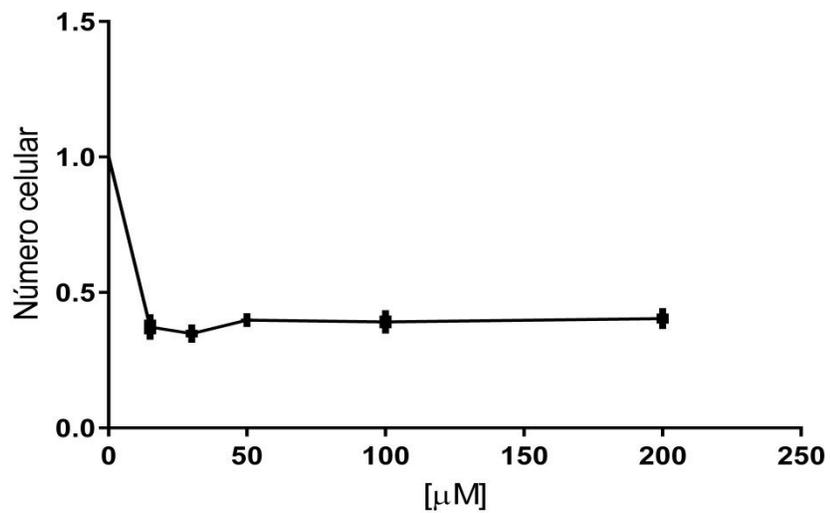
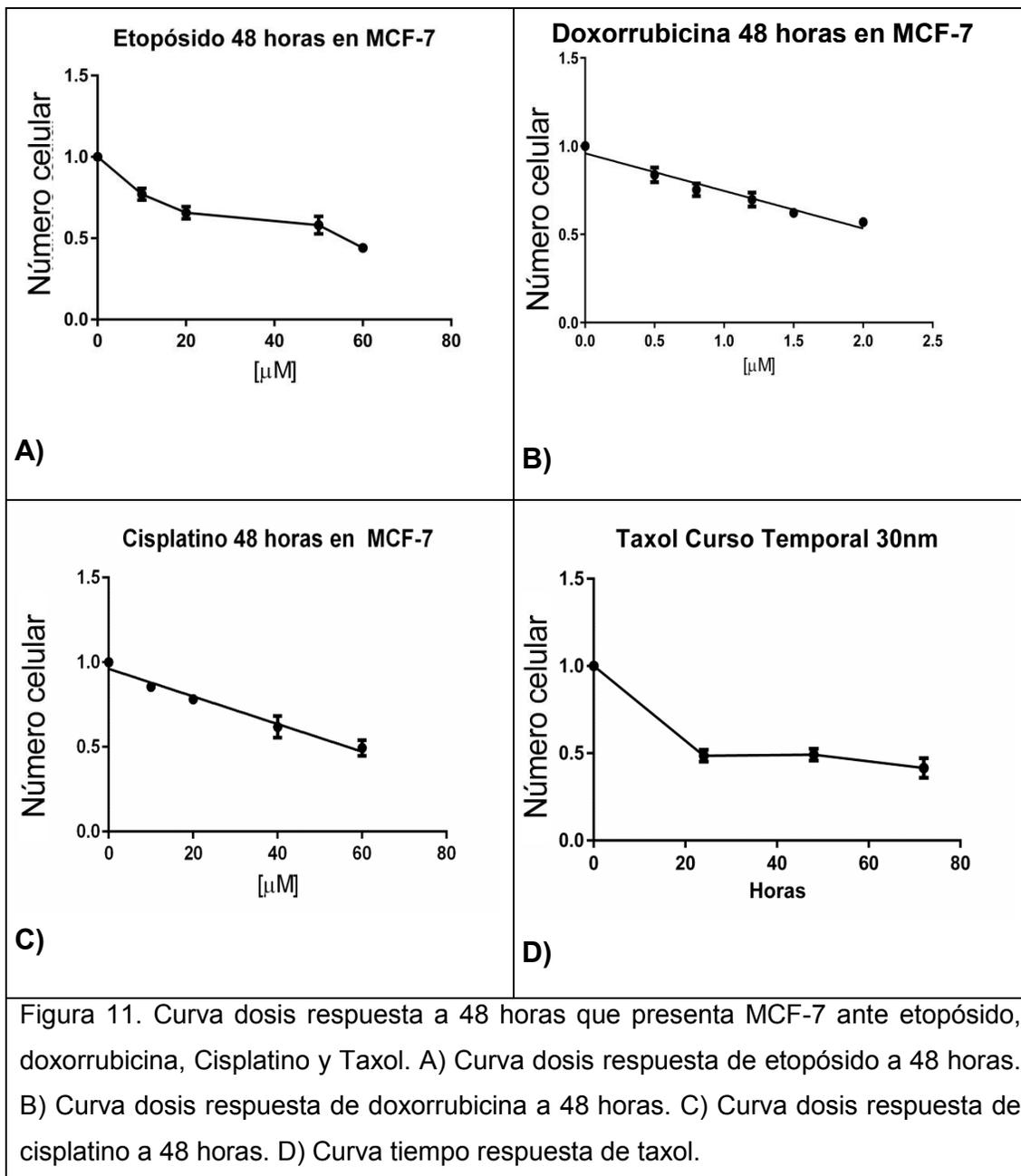


Figura 10. IC50 dosis respuesta Taxol a 72 horas



La expresión de NIK no afecta la quimio resistencia

Posteriormente, se evaluó la IC50 obtenida a partir de la línea parental en MCF-7 sobre las sublíneas MCF-7 LACZ, MCF-7-NIK-OE, MCF-7 LUC y MCF-7-NIK-LE, los antineoplásicos taxol, etopósido y cisplatino no mostraron ninguna

diferencia significativa en la sublínea MCF-7-NIK-OE con respecto a MCF-7 LACZ ni en la sublínea MCF-7-NIK-LE con respecto a MCF-7 LUC (Figura 12A-C). Interesantemente, en el tratamiento con doxorubicina, MCF-7 OE no tuvo una diferencia significativa con respecto a MCF-7-LACZ, sin embargo, la inhibición de NIK sensibilizo significativamente a MCF-7-LE con respecto a MCF-7-LACZ ante doxorubicina (Figura 12D)

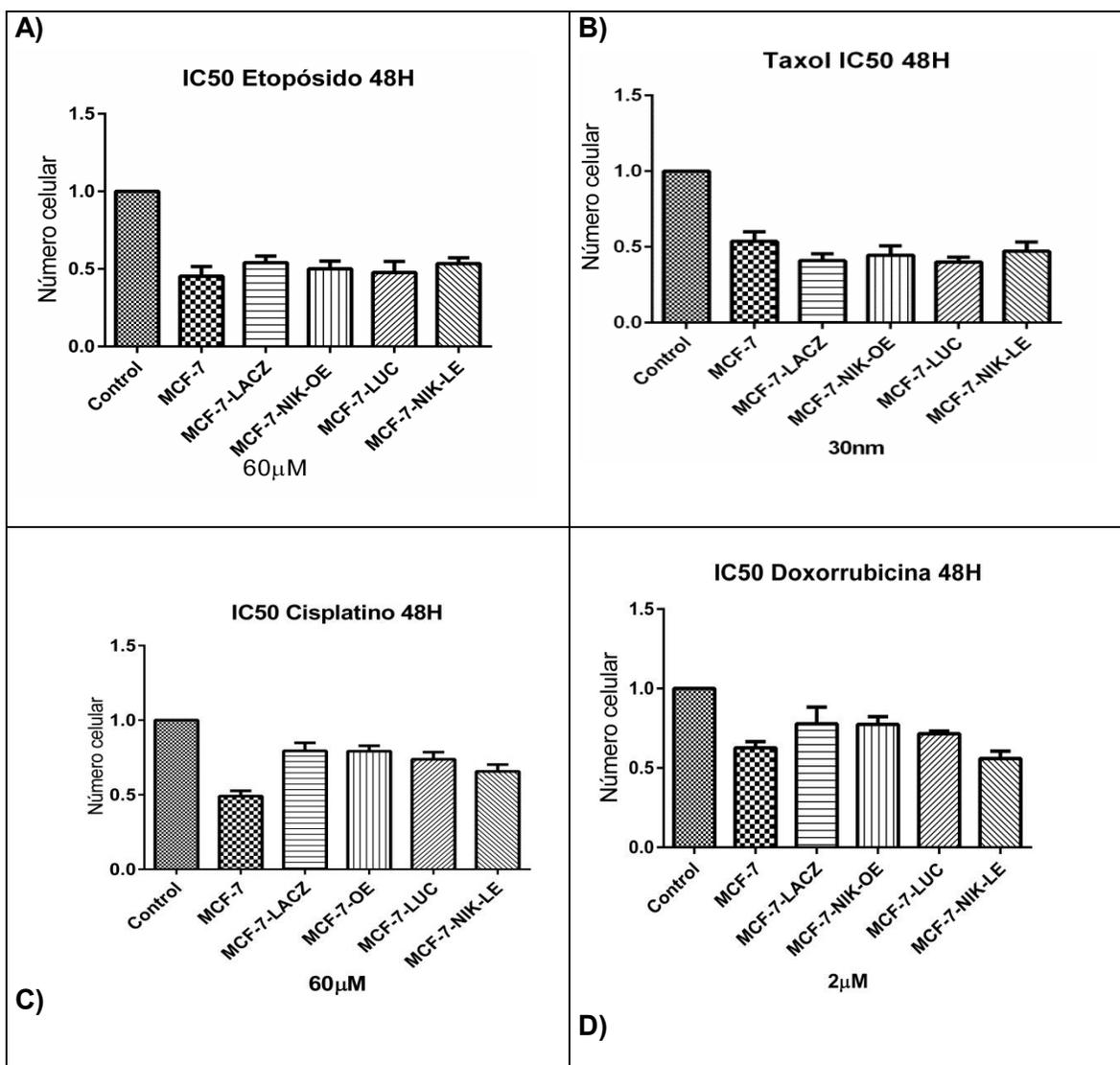


Figura 12. Comparación la IC50 en las sublíneas de MCF-7 sublíneas MCF-7, MCF-7-NIK-OE, MCF-7 LACZ, MCF-7 LUC y MCF-7-NIK-LE. A) comparación de la IC50 de etopósido. A) comparación de la IC50 de etopósido. B) Ccomportamiento ante taxol. C) comparación de la IC50 de cisplatino. D) comparación de la IC50 de doxorubicina

Dado que doxorrubicina fue el único fármaco que exhibió una diferencia significativa, se decidió evaluar la curva completa de dosis respuesta (Figura 13). Sin embargo, al comparar todos los puntos en la curva por ANDEVA, no se encontró diferencias significativas entre MCF-7 LUC y MCF-7-NIK-LE, lo que indica que no existe relación entre la expresión de NIK y la resistencia a doxorrubicina.

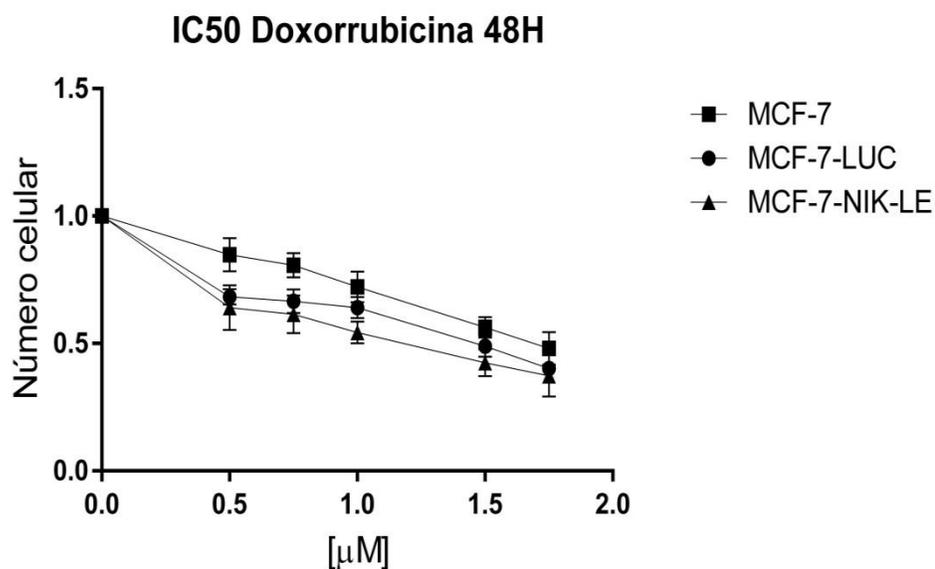


Figura 13. Curva dosis respuesta de doxorrubicina en MCF-7, MCF-7-LUC y MCF-NIK-LE.

VIII) Discusión

La vía de NF- κ B es considerada como un regulador clave en la quimiorresistencia ya que se ha probado que su activación está relacionada principalmente con la evasión de la muerte celular, sin embargo, esta actividad tiene un efecto diferencial dependiendo del tumor. Por ejemplo, la inactivación de NF- κ B es suficiente para inducir la muerte celular de manera basal en linfoma tipo T y en melanoma (Odqvist *et al*, 2013; Thu *et al*, 2012), además de incrementar la sensibilidad a agentes antineoplásicos en cáncer de colon y páncreas (W. Wang *et al*, 1999; Guo *et al*, 2004), sin embargo, en cáncer de ovario la inactivación de NF- κ B no ejerce efecto alguno en la muerte celular (Uno *et al*, 2014).

Los mecanismos por los que NF- κ B puede mediar la resistencia se extienden a la regulación transcripcional de moléculas implicadas directamente con la apoptosis como los inhibidores de la apoptosis XIAP1,2, survivina y Bcl-X (Karin y Lin, 2008). Además, NF- κ B ejerce un efecto protector contra los agentes antineoplásicos al regular la expresión de las bombas expulsoras de fármacos de la familia ABC (ABCG2 y MDR1). (Bentires-alj *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2011). Otro mecanismo por el cual NF- κ B ejerce un efecto sobre la resistencia es al regular los mecanismos de reparación del ADN (Volcic *et al*, 2011). Sin embargo, NF- κ B también es conocido por regular una población de células de cáncer tipo troncal en cáncer de mama las cuales son quimioresistentes *per se*. (Yamamoto *et al*, 2013; Kendellen *et al*, 2013).

Si bien es cierto que nuestros datos en principio indican que NIK, activador de la vía no canónica no es capaz de mediar la multirresistencia en el pool de células MCF-7, hay que tomar en cuenta que el cáncer de mama se encuentra constituido por diferentes subpoblaciones de células con capacidades tumorigénicas diferentes. De hecho, se ha reportado que solo la subpoblación identificada por el fenotipo CD44^{+alto}/ CD24^{-bajo} (fenotipo célula tipo troncal) es

capaz de reconstituir al tumor (Al-Hajj *et al*, 2003). En adición, se ha reportado que esta subpoblación es más resistente a los tratamientos con agentes antineoplásicos (Fillmore y Kuperwasser, 2008), lo que supone que el medir la quimiorresistencia solo a través de un modelo no es suficiente.

De hecho, existen diferentes modelos *in vitro* utilizados para estudiar la quimiorresistencia además del utilizado en el presente estudio, los cuales incluyen modelos de esferoides y modelos clonogénicos que sirven para probar de manera directa la quimiorresistencia de las subpoblaciones tipo célula troncal CD44^{+alto}/CD24⁻ (Cioce *et al.* 2010).

Por otra parte, hay que mencionar que a pesar de que se sobreexpresó e inhibió la expresión de NIK, no se comprobó la activación o inhibición de la vía no canónica, por lo que se propone realizar un ensayo de cambio de motilidad electroforética para asegurarse de que los dímeros p52 y RelB se encuentren realmente unidos a las secuencias κB y posteriormente realizar un ensayo de actividad luciferasa para asegurarse que la sobreexpresión e inhibición de NIK realmente active e inhiba respectivamente la activación de la vía no canónica.

Finalmente, hay que mencionar que si bien nuestros datos no demuestran que NIK interfiera directamente en la quimiorresistencia, se recomienda inhibir a NIK en las células MCF-7 resistentes que mostraron una sobreexpresión de NIK y comparar los cambios en la resistencia.

IX) Conclusión

El presente estudio logró generar sublíneas de MCF-7 que sobreexpresan a NIK o lo inhiben establemente. Adicionalmente, se obtuvo la IC50 de taxol, doxorubicina, cisplatino y etoposido en la línea parental MCF-7. Así mismo, se evaluó el estado de NIK y su relación con la resistencia a taxol, doxorubicina, cisplatino y etopósido, y no se encontró una relación entre la resistencia a estos fármacos y el estado de NIK en el pool de células, sin embargo, no se descarta probar otros modelos enfocados a probar la resistencia en la subpoblación tipo troncal de MCF-7 o en otros subtipos moleculares.

X) Referencias bibliográficas

- Abal, M, Andreu J. M., y Barasoain I. 2003. Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. *Current Cancer Targets* 3:193-203.
- Al-Hajj Muhammad, Wicha Max S, Benito-Hernandez Adalberto, Morrison Sean J, y Clarke Michael F. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *PNAS* 100: 3983–88.
- Allred D. C., Mohsin S K, and Fuqua S A W. 2001. "Histological and Biological Evolution of Human Premalignant Breast Disease." *Endocrine-Related Cancer* 8: 47–61.
- Almeida Luciana O., Abrahao Aline C., Rosselli-Murai Luciana K., Giudice Fernanda S., Zagni Chiara, Leopoldino Andreia M., Squarize Cristiane H., y Castilho Rogerio M. 2014. "NFκB Mediates Cisplatin Resistance through Histone Modifications in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)." *Behav of Federarion of European Biochemical Societies* 4 : 96–104.
- Alpsoy Aktan, Yasa Seda, y Gündüz Ufuk. 2014. "Etoposide Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cell Line Is Marked by Multiple Mechanisms." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68: 351–55.
- Angelini Pier Davide, Zacarias Fluck F. Mariano, Pedersen Kim, Parra-Palau Josep Lluís, Guiu Marc, Morales Cristina Bernadó, Vicario Rocio, Luque-Garcia Antonio, Navalpotro Nerea Peiro, Giralt Jordi, Canals Francesc, Gomis Roger R., Tabernero Josep, Baselga José y Villanueva Josep. 2013. "Constitutive HER2 Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis through Cellular Senescence." *Cancer Research* 73: 450–58.
- Arman Kaifee, Ergün Sercan, Temiz Ebru, y Öztuzcu Serdar. 2014. "The Interrelationship between HER2 and CASP3/8 with Apoptosis in Different Cancer Cell Lines." *Molecular Biology Reports* 41: 8031–36.
- Bazley L. A., y Gullick W. J.. 2005. "The Epidermal Growth Factor Receptor Family." *Endocrine-Related Cancer* 12: 17–28.
- Bednarski Brian K., Ding Xiaoyu, Coombe Kavita, Baldwin Albert S. y Hong Kim J. 2009. "Active Roles for IKKα and IκB in NF-κB-Mediated Chemoresistance to Doxorubicin." *Molecular Cancer Therapeutics* 7:1827–35.

-
-
- Bentires-alj Mohamed, Barbu Veronique, Fillet Marianne, Chariot Alain, Relic Biserka, Jacobs Nathalie, Gielen Jacques, Merville Marie-paule, y Bours Vincent. 1999. "NF-K B Transcription Factor Induces Drug Resistance through MDR1 Expression in Cancer Cells," *Oncogene* 22: 90–97.
- Brantley Diana M., Chen Chih-lin, Muraoka Rebecca S., Bushdid Paul B., Bradberry Jonathan L., Kittrell Frances, Medina Daniel, Matrisian Lynn M., Kerr Lawrence D. y Yull Fiona E. 2001. "Nuclear Factor-kappaB (NF-kappaB) Regulates Proliferation and Branching in Mouse Mammary Epithelium." *Molecular Biology of the Cell* 12: 1445–55.
- Brendel Alexander, Felzen Vanessa, Morawe Tobias, Manthey Dieter, y Behl Christian. 2013. "Differential Regulation of Apoptosis-Associated Genes by Estrogen Receptor Alpha in Human Neuroblastoma Cells." *Restorative Neurology and Neuroscience* 31: 199–211.
- Burstein Harold, Polyak Kornelia, Wong Susan, Lester Susan, y Kaelin Carolyn. 2004. "Ductal Carcinoma in Situ of the Breast." *The New England Journal of Medicine* 350: 1430–41.
- Cao Ning, Li Shiyong, Wang Zhaoqing, Ahmed Kazi Mokim, Degnan Michael E., Fan Ming, Dynlacht Joseph R. y Li Jian Jian. 2009. "NF-kappaB-Mediated HER2 Overexpression in Radiation-Adaptive Resistance." *Radiation Research* 171 : 9–21.
- Carey Lisa A., Dees, Claire E., Sawyer Lynda, Gatti Lisa, Moore Dominic T., Collichio Frances, Ollila David W, Sartor Carolyn I, Graham Mark L, y Perou Charles M. 2007. "The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes." *Clinical Cancer Research* : 13 : 2329–34.
- Chávarri-Guerra Yanin, Villarreal-Garza Cynthia, Liedke Pedro E. R., Knaul Felicia, Mohar Alejandro, Finkelstein Dianne M., y Goss Paul E. 2012. "Breast Cancer in Mexico: A Growing Challenge to Health and the Health System." *The Lancet Oncology* 13 e335–43.
- Chen Fei, Demers Laurence M., Vallyathan Val, Lu Yongju, Castranova Vincent, y Shi Xianglin. 1999. "Involvement of 5' -Flanking K B-like Sites within Bcl-X Gene in Silica-Induced Bcl-X Expression *." *The Journal of Biological Chemistry* 274 : 35591–95.
- Chen Zhijian J. 2005. "Ubiquitin Signalling in the NF-kappaB Pathway." *Nature Cell Biology* 7 : 758–65.

-
-
- Cheng Guojun, Weihua Zhang, Warner Margaret, y Gustafsson Jan-Ake. 2004. "Estrogen Receptors ER Alpha and ER Beta in Proliferation in the Rodent Mammary Gland." *PNAS* 101: 3739–46.
- Chew Helen K. 2001. "Adjuvant Therapy for Breast Cancer : Who Should Get What ?" *Medicine Cabinet* 174: 284–87.
- Cioce Mario, Gherardi Simona, Viglietto Giuseppe, Strano Sabrina, Blandino Giovanni, Muti Paola, y Ciliberto Gennaro. 2010. "Mammosphere-Forming Cells from Breast Cancer Cell Lines as a Tool for the Identification of CSC-like- and Early Progenitor-Targeting Drugs." *Cell Cycle* 9 : 2950–59.
- Davies Christina, Pan Hongchao, Jon Godwin, Gray Richard, Arriagada Rodrigo, Raina Vinod, Abraham Mirta, Medieros Alencar Victor Hugo, Badran Atef, Bonfill Xavier, Bradbury Joan, Clarke Michale, Collins Rory, Davis Susan R. Delmestri Antonella, Forbes John F. Peiman Haddad, Hou Ming-Feng, Inbar, Moshe, Khaled Hussein, Kielanowska Joanna, Kwan Wing-Hong, Mathew Beela S., Pienkowski Tadeuz, Rajan Balakrishnan, Rubach Maryna T., Tort Sera, Urrútia Gerald, Valentini Miriam, Wang Yoachem y Peto Richard. 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 : 805–16.
- deGraffenried L. A., Chandrasekar B., Friedrichs W. E., Doniz E., Silva J., Hidalgo M., Freeman J.W., y Weiss G. R. 2004. "NF- B Inhibition Markedly Enhances Sensitivity of Resistant Breast Cancer Tumor Cells to Tamoxifen." *Annals of Oncology* 15 : 885–90.
- Desmedt Christine, Haibe-Kains Benjamin, Wirapati Pratyaksha, Buyse Marc, Larsimont Denis, Bontempi Gianluca, Delorenzi Mauro, Piccart Martine, y Sotiriou Christos. 2008. "Biological Processes Associated with Breast Cancer Clinical Outcome Depend on the Molecular Subtypes." *Clinical Cancer Research* 14: 5158–65.
- Deveraux Quinn L., Roy Natalie, Stennicke Henning R., Arsdale Todd Van, Zhou Qiao, Srinivasula Srinivasa M., Alnemri Emad S., Salvesen Guy S. y Reed John C. 1998. "IAPs Block Apoptotic Events Induced by Caspase-8 and Cytochrome c by Direct Inhibition of Distinct Caspases". *EMBO Journal* 17: 2215–23.
- Dimri Goberdhan, Band Hamid, y Band Vimla. 2005. "Mammary Epithelial Cell Transformation: Insights from Cell Culture and Mouse Models." *Breast Cancer Research* 7: 171–79.

-
-
- Ellis I.O., S.J. Schnitt, G. Bussalati, and F.A Tavassoli. 2003. "CHAPTER 1 WHO Histological Classification of Tumours of the Breast." In *Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*, 432.
- Fabian C. J. 2007. "The What, Why and How of Aromatase Inhibitors: Hormonal Agents for Treatment and Prevention of Breast Cancer." *International Journal of Clinical Practice* 61: 2051–63.
- Fillmore Christine M. y Kuperwasser Charlotte. 2008. "Human Breast Cancer Cell Lines Contain Stem-like Cells That Self-Renew, Give Rise to Phenotypically Diverse Progeny and Survive Chemotherapy." *Breast Cancer Research* 10 : R25.
- Frech M. Silvina, Halama Ewa D., Tilli Maddalena T., Singh Baljit, Gunther Edward J, Chodosh Lewis A., Flaws Jodi A., y Furth Priscilla A. 2005. "Deregulated Estrogen Receptor Alpha Expression in Mammary Epithelial Cells of Transgenic Mice Results in the Development of Ductal Carcinoma in Situ." *Cancer Research* 65: 681–85.
- Guinebretière J. M., Menet E., Tardivon A., Cherel P., and Vanel D. 2005. "Normal and Pathological Breast, the Histological Basis." *European Journal of Radiology* 54 : 6–14.
- Guo Jun, Verma Udit N., Gaynor Richard B., Frenkel Eugene P., y Becerra Carlos R. 2004. "Enhanced Chemosensitivity to Irinotecan by RNA Interference-Mediated down-Regulation of the Nuclear Factor-kB p65 Subunit." *Clinical Cancer Research* 10: 3333–41.
- Hainsworth J. D., y Greco F. A. 1995. "Etoposide: Twenty Years Later." *Annals of Oncology* 6: 325–41.
- Hallett Robin M., Dvorkin-Gheva Anna, Bane Anita, y Hassell John A. 2012. "A Gene Signature for Predicting Outcome in Patients with Basal-like Breast Cancer." *Scientific Reports* 2 : 227.
- Harte M. T., Gorski J. J. , Savage K. I., Purcell J. W., Barros E. M, Burn P. M., McFarlane C, y Kennedy R. D. 2014. "NF- κ B Is a Critical Mediator of BRCA1-Induced Chemoresistance." *Oncogene* 33: 713–23.
- Hayden Matthew S., y Ghosh Sankar. 2008. "Shared Principles in NF-kappaB Signaling." *Cell* 132 : 344–62.
- Herschkowitz Jason I., Simin Karl, Weigman Victor J., Mikaelian Igor, Usary Jerry, Hu Zhiyuan, Rasmussen Karen E., Jones Laundette P., Assefnia Shahin, Chandrasekheran Subhashini, Backlund Michael G., Yin Yuzhi,

Khramtsov I., Bastein Roy, Quackenbush John, Glazer robert I., Brown Powel H., Green Jeffrey E., Kopleovich Levy, Furth Priscilla A., Palazzo Juan P., Olopade Olufunmilayo I., Bernard Philip S., Churchill Gary A., Dyke Terry Van y Perou Charles M. 2007. "Identification of Conserved Gene Expression Features between Murine Mammary Carcinoma Models and Human Breast Tumors." *Genome Biology* 8: R76.

Honig Arnd, Rieger Lorenz, Sutterlin Marc, Wallwiener Diethelm, Dietl Johannes, Solomayer Erich-Franz..2005."State of the Art of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: Rationale, Results And Recent Developments"GMS German Medical Science 3:1612: 3174

Hong Sang-yong, Yoon Wan-hee, Park Ji-hyun, Kang Seung-goo, Ahn Jin-hyung, y Lee Tae H. 2000. "Involvement of Two NF-kB Binding Elements in Tumor Necrosis Factor Alpha, CD40- , and Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1-Mediated Induction of the Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2 Gene " *The Journal of Biological Chemistry* 275 : 18022–28.

Hudis Clifford A., y Gianni Luca. 2011. "Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need." *The Oncologist* 16: 1–11.

Huxford Tom, Huang De-Bin, Malek Shiva, y Ghosh Gourisankar. 1998. "The Crystal Structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB Complex Reveals Mechanisms of NF-kappaB Inactivation." *Cell* 95 : 759–70.

INEGI. 2014. "DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) ", 1–11. <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

Jana Debarshi, Das Soumen, Sarkar Diptendra Kumar, Mandal Syamsundar, Maji Abhiram, y Mukhopadhyay Madhumita. 2012. "Role of Nuclear Factor-kB in Female Breast Cancer: A Study in Indian Patients" *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*13: 5511–15.

Jesinger, Robert A. 2014. "Breast Anatomy for the Interventionalist." *Techniques in Vascular and Interventional Radiology* 17: 3–9.

Joensuu H. y Gligorov J. 2012. "Adjuvant Treatments for Triple-Negative Breast Cancers." *Annals of Oncology* 23 : 40–45.

Johnston Stephen R. D. 2005. "Endocrinology and Hormone Therapy in Breast Cancer: Selective Oestrogen Receptor Modulators and Downregulators for Breast Cancer - Have They Lost Their Way?" *Breast Cancer Research* 7: 119–30.

-
-
- Kao Kuo-Jang, Chang Kai-Ming, Hsu Hui-Chi, y Huang Andrew T. 2011. "Correlation of Microarray-Based Breast Cancer Molecular Subtypes and Clinical Outcomes: Implications for Treatment Optimization." *BMC Cancer* 11 : 143.
- Karin Michael y Lin Anning. 2002. "NF- κ B at the Crossroads of Life and Death." *Nature Immunology* 3: 221–27.
- Kendellen M.F., Bradford J.W., Lawrence C.L., Clark K.S., Baldwin A.S. 2014. Canonical and Non-Canonical NF- κ B Signaling Promotes Breast Cancer Tumor-Initiating Cells. *Oncogene* 33:1297-1305.
- Knaul Felicia Marie, Nigenda Gustavo, Lozano Rafael, Arreola-Ornelas Hector, Langer Ana, y Frenk Julio. 2008. "Breast Cancer in Mexico: A Pressing Priority." *Reproductive Health Matters* 16: 113–23.
- Lewander Andreas, Gao Jingfang, Carstensen John, y Arbman Gunnar. 2012. "NF-Kappa B p65 Phosphorylated at Serine-536 Is an Independent Prognostic Factor in Swedish Colorectal Cancer Patients." *International Journal of Colorectal Disease* 27: 447–52.
- Liebmann J. E., Cook J. A., Lipschultz C., Teague D., Fisher J., y Mitchel J.B. 1993. "Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol ®) in Human Tumour Cell Lines." *Cancer* 68: 1104–9.
- Lips E. H., Mulder L., De Ronde J. J., Mandjes I. A. M., Koolen B. B., Wessels L. F. A., Rodenhuis S. y Wesseling J. 2013. "Breast Cancer Subtyping by Immunohistochemistry and Histological Grade Outperforms Breast Cancer Intrinsic Subtypes in Predicting Neoadjuvant Chemotherapy Response." *Breast Cancer Research and Treatment* 140: 63–71.
- Marino Maria, Galluzzo Paola, y Ascenzi Paolo. 2006. "Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription" *current genomics* 7: 497–508.
- Minckwitz G. Von y Martin M. 2012. "Neoadjuvant Treatments for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC)." *Annals of Oncology* 23: 35–39. .
- Moasser Mark M. 2007. "The Oncogene Her2; Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis." *Oncogene* 26: 6469–87.
- Molyneux Gemma, Geyer Felipe C., Magnay Fiona-Ann, McCarthy Afshan, Kendrick Howard, Natrajan Rachael, Mackay Alan, Reis-Filho Jorge S. y Smalley Matthew J. 2010. "BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from

Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 7 : 403–17.

Morotti A., Cilloni D., Pautasso M., Messa, F., Arruga F., Defilippi I., Carturan S., Catalano R., Rosso V., Chiarenza A., Taulli R, Bracco E., Rege-Cambrin G., Gottardi E. y Saglio G. 2006. “NF- κ B Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-Induced Apoptosis in K562 Cell Line” *American Journal of Hematology* 81: 938–45.

Odqvist Lina, Sánchez-Beato Margarita, Montes-Moreno Santiago, Martín-Sánchez Esperanza, Pajares Raquel, Sánchez-Verde Lydia, Ortiz-Romero Pablo L., Rodríguez Jose, Rodríguez-pinilla Socorro M., Iniesta-Martínez Francisca, Solera-Arroyo Juan Carlos, Ramos-Asensio Rafael, Flores Teresa, Menarguez Palanca Javier y Bragado Federico García. 2013. “NIK Controls Classical and Alternative NF- κ B Activation and Is Necessary for the Survival of Human T-Cell Lymphoma Cells.” *Clinical Cancer Research* 19: 2319–30.

Osborne C. K., Wakeling A, y Nicholson R I. 2004. “Fulvestrant: An Oestrogen Receptor Antagonist with a Novel Mechanism of Action.” *British Journal of Cancer* 90 : S2–6.

Oviedo Pilar J., Sobrino Agua, Laguna-Fernandez Andrés, Novella Susana, Tarín Juan, García-Pérez Miguel-Angel, Sanchís Juan, Cano Antonio, y Hermenegildo Carlos. 2011. “Estradiol Induces Endothelial Cell Migration and Proliferation through Estrogen Receptor-Enhanced RhoA/ROCK Pathway.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 335 . 96–103.

Peng Yuang., Bing-He Xu, Jia-ju Wang, Fei Ma, Fan, Ying Quing Li, y Pin Zhang. 2012. “Oral Etoposide Monotherapy Is Effective for Metastatic Breast Cancer With heavy Prior Therapy” *Chinese Medical Journal* 125 : 775–79.

Perou Charles M., Sørlie Therese, Eisen Michael B., Rijn Matt Van de ,Jeffrey StefanieS., Rees Christian A.,Pollack Jonathan R.Ross Douglas T., Pergamenschikov Alexander, Williams Cheryl,Zhu Shirley X, Lonin Per E.Borresen-Dale Anne Lise, Brown Patric O. y Botstein David. 2000. “Molecular Portraits of Human Breast Tumours.” *Nature* 406 : 747–52.

Prat Aleix, y Perou Charles M. 2011. “Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer.” *Molecular Oncology* 5 : 5–23.

Pratt MAC, Tibbo E.,Robertson S.J., Jansson D., Hurst K., Perez-Iratxeta C., Lau R., y Niu M. Y. 2009. “The Canonical NF- κ B Pathway Is Required for Formation of Luminal Mammary Neoplasias and Is Activated in the Mammary Progenitor Population.” *Oncogene* 28:2710–22.

-
-
- Rayet Béatrice y Gélinas Céline. 1999. "Aberrant Rel/nfkb Genes and Activity in Human Cancer." *Oncogene* 18: 6938–47.
- Rouzier Roman, Perou Charles M., Symmans Freaser W., Ibrahim Nuhad, Cristofanilli Massimo, Anderson Keith, Hess Kenneth R., Stec James, Ayers Mark, Wagner Peter, Morandi Paolo, Fan Chang, Rabiul Islam, Ross Jeffrey S., Hortobagyi gabriel N. y Puztai lajos. 2005. "Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy." *Clinical Cancer Research* 11: 5678–85.
- Saitoh Yasunori, Martínez Bruyn Vicente Javier, Shin Uota, Hasegawa Atsuhiko, Yamamoto Naoki, Imoto Issei, Inazawa Johji, y Yamaoka Shoji. 2010. "Overexpression of NF-κB Inducing Kinase Underlies Constitutive NF-κB Activation in Lung Cancer Cells." *Lung Cancer* 70: 263–70.
- Saitoh Yasunori, Yamamoto Norio, Dewan Zahidunnabi M., Sugimoto Haruyo, Martinez Bruyn Vicente J., Iwasaki Yuki, Matsubara Katsuyoshi, Qi Xiaohua, Saitoh Tatsuya, Imoto Issel, Inazawa Johji, Utsunomiya Atae, Watanabe Toshiki, Masuda Takao, Yamamoto Naoki y Yamaoka Shoji. 2008. "Overexpressed NF- κB Inducing Kinase Contributes to the Tumorigenesis of Adult T-Cell Leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg Cells." *Blood* 111: 5118–30.
- Schroeder Richard L, Stevens Cheryl L., y Jayalakshmi Sridhar. 2014. "Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the Treatment of Aggressive Breast Cancer." *Molecules* 19: 15196–212.
- Shukla Sanjeev, Maclennan Gregory T., Fu Pingfu, Patel Jigar, Marengo Susan R, y Resnick Martin I. 2004. "Nuclear Factor- N B / p65 (Rel A) Is Constitutively Activated in Human Prostate Adenocarcinoma and Correlates with Disease Progression." *Neoplasia* 6 : 390–400.
- Siddik Zahid H. 2003. "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance." *Oncogene* 22 : 7265–79.
- Sørliie Therese, Charles M Perou, Tibshirani Robert, Aas Turid, Geisler Stephanie, Johnsen Hilde, Hastie Trevor, Elsen Michael B., Rijn Matt Van de, Jeffrey Stefanie S. Thorsen Thor, Quist Hanne, Matese John C., Brown Patrick O., Botstein David, Lonning Eystein Per y Dale-Borrseesen Anne-Lise. 2001. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *PNAS* 98: 10869–74.
- Sotiriou Christos, y Lajos Puztai. 2009. "Gene Expression Signatures in Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 360 : 790–800.

-
-
- Sun Shao-Cong. 2011. "Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway." *Cell Research* 21: 71–85.
- Tan Huining, Zhong Yili, y Pan Zhongzong. 2009. "Autocrine Regulation of Cell Proliferation by Estrogen Receptor-Alpha in Estrogen Receptor-Alpha-Positive Breast Cancer Cell Lines." *BMC Cancer* 9: 31.
- Tegze Bálint, Szállási Zoltán, Haltrich Irén, Péntzváltó Zsófia, Tóth Zsuzsa, Likó István, y Gyorffy Balázs. 2012. "Parallel Evolution under Chemotherapy Pressure in 29 Breast Cancer Cell Lines Results in Dissimilar Mechanisms of Resistance." *PloS One* 7 : e30804.
- Thorn Caroline F. ;Oshiro Conie, Marsh Sharon, Hernandez-Boussard Tina, Mcleod Howard, Klein Teri E., y Altman Russ B. 2012. "Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects." *Pharmacogenet Genomics* 21 : 440–46.
- Thu Yee Mon, B. A., Su Yingjun, Yang Jinming, Splittgerber Ryan, Na Songqing, Boyd Alan, Mosse Claudio, Simons Christopher y Ann Richmond. 2012. "NF-KB Inducing Kinase (NIK) Modulates Melanoma Tumorigenesis by Regulating Expression of pro-Survival Factors through the B-Catenin Pathway." *Oncoge* 31: 2580–92.
- Tilli Maddalena T., Frech M. Silvina, Steed Mary E., Hruska Kathleen S., Johnson Michael D., Flaws Jodi A., y Furth Priscilla A. 2003. "Introduction of Estrogen Receptor-Alpha into the tTA/TA γ Conditional Mouse Model Precipitates the Development of Estrogen-Responsive Mammary Adenocarcinoma." *The American Journal of Pathology* 163. American Society for Investigative Pathology: 1713–19.
- Uno Masaya, Saitoh Yasunori, Mochida Kanako, Tsuruyama Eri, Kiyono Tohru, Imoto Issei, Inazawa Johji, Yuasa Yasuhito, Kubota Toshiro, y Yamaoka Shoji. 2014. "NF- K B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- K B, Contributes to Ovarian Cancer Progression." *PLoS ONE* 9: e88347.
- Volcic Meta Karl Sabine, Baumann Bernd, Salles Daniela, Daniel Peter, Fulda Simone y Wiesmüller Lisa. 2011. "NF- κ B Regulates DNA Double-Strand Repair in Conjunction With BRCA--CtIP Complex." *Nucleic Acids Research* 40: 181–95.
- Vu Thuy, y Claret Francois X. 2012. "Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer." *Frontiers in Oncology* 2: 1–6.

-
-
- Wang Cun-Yu, Mayo Marty W, y Baldwin Albert S.1996. "TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF-kappaB." *Science* 274: 784–87.
- Wang Weixin, James Abbruzzese James L., Evans Douglas B., Larry Lillie, Cleary Karen R, y Chiao Paul J. 1999. "The Nuclear Factor- kB RelA Transcription Factor Is Constitutively Activated in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells." *Clinical Cancer Research* 5: 119–27.
- Wardell Suzanne E., Nelson Erik R., y McDonnell Donald P.. 2014. "From Empirical to Mechanism-Based Discovery of Clinically Useful Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)." *Steroids* 90: 30–38.
- Wharry Catherine E., Haines Kathleen M., Carroll Richard G., y May Michael J. 2009. "Constitutive Non-Canonical NFkB Signaling in Pancreatic Cancer Cells." *Cancer Biology and Therapy* 8 : 1567–76.
- WHO. 2015. "Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises to 14 . 1 Million New Cases in 2012 : Marked Increase in Breast Cancers Must Be Addressed Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises to 14 . 1 Million New Cases in 2012 : Marked Incr." https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf
- Wieduwilt M. J. y Moasser M. M.. 2008. "The Epidermal Growth Factor Receptor Family: Biology Driving Targeted Therapeutics." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 : 1566–84.
- Xiao Gutian, Harhaj Edward W, y Sun Shao-cong. 2001. "NF- B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- B2 p100." *Molecular Cell* 7: 401–9.
- Xu Yong, Fang Fang, Clair Daret K St, Sompol Pradoldej, Josson Sajni, y Clair William H St. 2008. "SN52 , a Novel Nuclear Factor- K B Inhibitor , Blocks Nuclear Import of RelB : p52 Dimer and Sensitizes Prostate Cancer Cells to Ionizing Radiation." *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 2367–77.
- Yamamoto Mizuki, Ito Taku, Shimizu Takafumi, Ishida Takaomi, Semba Kentaro, Watanabe Shinya, Yamaguchi Noritaka, y Inoue Jun-Ichiro. 2010. "Epigenetic Alteration of the NF-kB-Inducing Kinase (NIK) Gene Is Involved in Enhanced NIK Expression in Basal-like Breast Cancer." *Cancer Science* 101: 2391–97.
- Yamamoto Mizuki, Taguchi Yuu, Ito-Kureha Taku, Semba Kentaro, Yamaguchi Noritaka, y Inoue Jun-ichiro. 2013. "NF-kB Non-Cell-Autonomously Regulates Cancer Stem Cell Populations in the Basal-like Breast Cancer Subtype." *Nature Communications* 4 : 2299.

-
-
- Yan Min, Schwaederle Maria, Arguello David, Millis Sherri Z., Gatalica Zoran, y Kurzrock Razelle. 2015. "HER2 Expression Status in Diverse Cancers: Review of Results from 37,992 Patients." *Cancer and Metastasis Reviews* 34: 157-64.
- Yerushalmi R., Hayes M. M, y Gelmon K. A.. 2009. "Breast Carcinoma--Rare Types: Review of the Literature." *Annals of Oncology* 20:1763–70. .
- Yip Cheng Har, Smith Robert A., Anderson Benjamin O., Miller Anthony B., Thomas David B., Ang Eng Suan, Caffarella Rosemary S., Corbex Marilys, Kreps Gary L., y Tiernan Anne Mc. 2008. "Guideline Implementation for Breast Healthcare in Low- and Middle-Income Countries: Early Detection Resource Allocation." *Cancer* 113: 2244–56.
- Zhou Jiangbing, Zhang Hao, Bal Jining, Margolick Josep B., y Zhang Ying. 2008. "NF-KB Pathway Inhibitors Preferentially Inhibit Breast Cancer Stem-like Cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 111 : 419–27.
- Zhang Weijia, Ding Wei, Chen Ye, Feng Meilin, Ouyang Yongmei, Yu Yanhui, y He Zhimin. 2011. "Up-Regulation of Breast Cancer Resistance Protein Plays a Role in HER2-Mediated Chemoresistance through PI3K / Akt and Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathways in MCF7 Breast Cancer Cells" 43 : 647–53.
- Zhang Weizhou, Tan Wei, Wu Xuefeng, Poustovoitov Maxim, Strasner Amy, Li Wei, Borcharding Nicholas, Ghassemian Majid, y Karin Michael. 2013. "A NIK-IKK?? Module Expands ErbB2-Induced Tumor-Initiating Cells by Stimulating Nuclear Export of p27/Kip1." *Cancer Cell* 23 : 647–59.