



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Modulación genética de la autofagia en líneas
celulares 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

Arely Rosas Cruz

Asesor:

Dra. Paola Maycotte González

Asesor interno:

M. en C. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2019



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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 Tesís.

Modulación genética de la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama.

Que presenta la pasante: Arely Rosas Cruz
Con número de cuenta: 414005831 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 19 de Octubre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

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

LMCF/cga*

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social, en el municipio de Atlixco, Puebla, durante el periodo agosto 2017-2018, bajo la tutoría de la Dra. Paola Maycotte González.

DEDICATORIA

Sin duda alguna, los párrafos más difíciles de este trabajo no fueron los de la discusión o resultados, sino los que se plasman a continuación, pues muchas ocasiones me es difícil expresar mis sentimientos y estos apartados son muy emotivos.

A mis padres, porque sin ellos no hubiera podido llegar hasta este momento. Gracias a ustedes, mamá y papá, por estar conmigo a pesar de la distancia, pero con sus pláticas de aliento y con el hecho de preocuparse por mí, es suficiente para alegrar mi día. Simplemente, no sé qué haría sin ustedes. Gracias por sus enseñanzas, por sus regaños, por sus buenos consejos, porque como resultado de lo anterior soy la persona en la que me he convertido y espero poder devolverles todo lo que me dieron y más. Realmente, no hay forma en que yo pueda pagar todo lo que han hecho por mí. Porque ustedes, junto con mis hermanos son lo que más amo en la vida.

A mis hermanos, porque sin sus ocurrencias la vida no sería la misma. Gracias por ser quiénes son y por alegrarme mis días. Por todos los momentos que disfrutamos en familia. Anahí, gracias por siempre sacarme una sonrisa y por tener la confianza que me tienes, por contarme todas tus historias y pedirme consejos; hermana siempre estaré para ti cuando me necesites y no dudes que te amo. Daniel, gracias por tus anécdotas, porque las historias que nos compartes nos han ayudado como familia y a que valoremos y disfrutemos cada día de nuestra vida; te amo hermano.

A mi abuelita Flavia, por estar conmigo en todo momento. Mis logros son para ti, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio Reyes Leyva, por darme la oportunidad de realizar mi tesis de en el Centro de Investigación.

A la doctora Paola, por brindarme la oportunidad, apoyo y confianza para poder concluir esta etapa de mi vida. Por todo el conocimiento aportado y por las enseñanzas que me llevo al ser su alumna. Gracias por la pasión que transmite en cada plática, pues eso me ha inspirado para continuar por el camino de la ciencia.

A la profesora Maritere, por apoyarme en la realización de este proyecto y estar siempre al pendiente de mí. Por la pasión que contagia al dar sus clases de Biología y Genética molecular.

A mis amigos de la universidad, en especial a Rebeca; gracias amiga por estar siempre en todo momento, y a pesar de la distancia, nuestra amistad continúa y espero que siga así por muchos años más. Gracias por brindarme la confianza y abrirme las puertas de tu casa.

A mis amigos del CIBIOR, porque mi estancia en el Centro de Investigación no hubiera sido lo mismo sin ustedes. Gracias por darme su confianza, por los buenos y malos momentos, por las anécdotas, consejos, por sus locuras, por ser tan ocurrentes y por hacer los días de trabajo, algo divertido.

A mis compañeras de casa, porque sin ustedes las comidas de fin de semana no serían lo mismo. Gracias por escucharme cuando estaba decepcionada pensando que no servía para realizar experimentos, por todos los momentos compartidos, por las salidas y por

las risas compartidas. Mi estancia en Atlixco fue de lo mejor por ustedes. Siempre las recordaré con mucho cariño.

A Israel Cotzomi, por todas las enseñanzas que me llevo al ser tu esclava, jaja no es cierto, al ser tu pequeña alumna. Gracias por inculcarme el hábito de la lectura, por exigirme, porque sabías que siempre podía dar más y ser mejor. Agradezco el tiempo y el conocimiento que me brindaste, porque gracias a ello, me ayudaste a ser mejor estudiante y profesionista.

A mis profesores, por todo el conocimiento enseñado dentro de las aulas, por las anécdotas y buenos momentos. Por los buenos consejos y el apoyo brindado, y porque no, por hacernos sufrir en cada examen. Gracias a ustedes aprendí que no todo en la vida es estudiar, sino aplicar lo aprendido en la escuela para poder solucionar problemas en la vida y ser críticos.

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía?

Para eso, sirve para caminar”.

Eduardo Galeano

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATG o Atg	Relacionado a la autofagia (proteínas)
ATG o Atg	Relacionado a autofagia (genes)
ATG7	Proteína relacionada a la autofagia 7 (humano)
Becn 1	Proteína Beclin 1 (Atg6)
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Linfoma de células B2
cDNA	DNA de cadena complementaria
AMC	Autofagia mediada por chaperonas
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CQ	Cloroquina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EROS	Especies reactivas de oxígeno
GFP-LC3	<i>Green fluorescent protein-light chain 3</i>
HB	Bromuro de hexadimetrina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
HOPS	Complejo de fusión homotípica y clasificación de proteínas
HSC-70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IA	Inhibidores de la aromatasa
IARC	Agencia Internacional en la Investigación de Cáncer
IHC	Inmunohistoquímica
JAK	Janus cinasa
KFERQ	Motivo pentapeptídico
LAMP2A	Proteína asociada a membrana lisosomal 2 A
LC3	Proteína asociada a microtúbulos cadena ligera 3

LKB1	Cinasa hepática B1
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MDA-MB-231	<i>M.D. Anderson Metastasis Breast Cancer</i>
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos
NS	No silenciante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Sitio de ensamblaje del fagóforo
PD-1	Muerte celular programada-1
PD-L1	Ligando de la muerte celular programada-1
PE	Fosfatidiletanolamina
PEI	Polietilenimina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
QT	Quimioterapia
RB1CC1	Proteína bovina 1 enrollable en espiral
RE	Receptor de estrógenos
RH	Receptores hormonales
RP	Receptor de progesterona
SASP	Fenotipo secretorio asociado a senescencia
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	RNA de horquilla corta
SNAP29	Proteína 29 asociada al sinaptosoma
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
STAT	Transductor de señal y proteínas de transcripción

STX17	Sintaxina 17
TEMED	N’N’N’N’-tetrametiletildiamina
ULK1/2	Cinasa activadora de autofagia parecida a Unc-51 1/2
US	Ultrasonido
VAMP8	Proteína de membrana 8 asociada a la vesícula

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la mama normal.....	16
Figura 2. Pasos de la autofagia.....	33
Figura 3. El proceso autofágico y algunos de sus principales reguladores.....	37
Figura 4. Autofagia en la transformación maligna y en la progresión tumoral.	44
Figura 5. Procesamiento de un shRNA para el silenciamiento de un gen	53
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pLKO.1 obtenido del protocolo de mini-prep.....	74
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pLKO.1, 80V/50 min, TAE 1x obtenido del protocolo de Maxi-prep.....	75
Figura 8. Silenciamiento de la proteína Beclin 1 en líneas celulares de cáncer de mama de ratón.....	76
Figura 9. Silenciamiento de la proteína ATG7 en líneas celulares de cáncer de mama de origen humano.....	77
Figura 10. El procesamiento de LC3 varía dependiendo de la proteína silenciada de la autofagia.....	78
Figura 11. La inhibición genética de la autofagia no modifica la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo de ratón.	79
Figura 12. La inhibición genética de la autofagia disminuye la proliferación de las líneas celulares triple negativo de origen humano.	80
Figura 13. La inhibición genética de la autofagia no altera la muerte celular en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo de ratón.	81
Figura 14. La inhibición de la autofagia induce la muerte de las células triple negativo humanas.....	82
Figura 15. La inhibición de la autofagia aumenta la muerte de las células triple negativo humanas.....	83
Figura 15. Mapa del vector pLKO.1.....	107
Figura 16. Sitio de reconocimiento de la enzima NotI	112

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama	20
Tabla 2. Concentraciones de puromicina para líneas celulares de cáncer de mama	66
Tabla 3. Concentración y pureza del DNA plasmídico obtenido del protocolo de mini-prep	73
Tabla 4. Concentración y pureza del DNA plasmídico purificado obtenido del protocolo de Maxiprep	75
Tabla 5. Plásmidos empaquetadores utilizados para la producción de lentivirus	110
Tabla 6. Descripción de las líneas celulares utilizadas para esta investigación	111

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
Índice de figuras.....	10
Índice de tablas.....	11
RESUMEN.....	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 Cáncer de mama.....	16
1.1.1 Definición.....	16
1.1.2 Epidemiología	17
1.1.3 Clasificación.....	18
1.1.4 Etiopatogenia.....	21
1.1.5 Manifestaciones clínicas	23
1.1.6 Diagnóstico	23
1.1.7 Tratamiento	25
1.2 Autofagia.....	29
1.2.1 Maquinaria de la autofagia.....	33
1.2.2 Importancia de la autofagia.....	38
1.3 Autofagia y cáncer	41
1.4 Autofagia y cáncer de mama.....	47
1.5 shRNA.....	51
2. Antecedentes.....	54
3. Justificación	56
4. Objetivos.....	57
4.2 Objetivo general.....	57
4.3 Objetivos particulares.....	57
5. Hipótesis	57
6. Diagrama de flujo experimental	58
7. Metodología.....	59
7.2 Transformación bacteriana.....	59
7.3 Extracción de DNA plasmídico por la técnica de Mini-prep.....	59
7.4 Digestión enzimática por NotI	60

7.5 Comprobación del DNA plasmídico extraído por electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	60
7.6 Extracción de DNA plasmídico por la técnica de Maxi-prep	61
7.7 Purificación del DNA plasmídico mediante precipitación con polietilenglicol. 62	
7.8 Cultivo celular.....	64
7.9 Producción de lentivirus.....	64
7.10 Transducción de líneas celulares de cáncer de mama.....	65
7.11 Evaluación del silenciamiento de la autofagia por medio de Western blot	66
7.12 Ensayo de proliferación celular mediante microscopía en tiempo real con el equipo IncuCyte ZOOM.....	70
7.13 Ensayo de muerte celular en el equipo IncuCyte ZOOM	71
7.14 Evaluación del procesamiento de LC3 mediante Western blot	71
8. Resultados.....	73
9. Discusión	84
10. Conclusiones	93
11. Perspectivas	94
12. Referencias	95
ANEXOS	103
Anexo 1. Soluciones y reactivos	103
Anexo 2. Plásmido pLKO.1	107
Anexo 3. Vectores lentivirales	108
Anexo 4. Plásmidos empaquetadores	110
Anexo 5. Líneas celulares	111
Anexo 6. Especificaciones de la enzima NotI.....	112

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo, considerado por la OMS como uno de los padecimientos predominantes a nivel mundial. En México, ocupa el segundo lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años. En el cáncer, diversos procesos se encuentran alterados y uno de ellos es la autofagia, la cual es la principal vía de degradación de organelos y proteínas dañadas o de larga vida, permitiendo el reciclaje del material intracelular. En condiciones normales, la autofagia basal se ha propuesto como un mecanismo supresor de tumores, sin embargo, también puede funcionar como un mecanismo de supervivencia en tumores establecidos. El objetivo de este trabajo es inhibir genéticamente la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama, tanto de humano (MCF7 y MDA-MB-231) como de origen murino (4T1 y 67NR), mediante el silenciamiento de proteínas importantes de la autofagia (ATG7 y Beclin 1), verificar el silenciamiento por medio de Western Blot y evaluar el efecto de este sobre la proliferación, muerte celular y procesamiento de LC3. De acuerdo con los resultados obtenidos, la línea celular MDA-MB-231 del subtipo triple negativo mostró sensibilidad a la inhibición genética de la autofagia con un shRNA contra ATG7 en comparación con la línea celular MCF7 de cáncer de mama RE+ de origen humano. Sin embargo, las líneas celulares de cáncer de mama del subtipo triple negativo de origen murino no fueron sensibles a la inhibición genética de la autofagia con un shRNA contra Beclin 1. En relación al procesamiento de LC3, al silenciar Beclin 1, se observó un incremento en la proteína LC3II, lo cual puede sugerir un aumento en el flujo autofágico, una acumulación de autofagosomas, o bien, un aumento en el procesamiento de LC3 independiente de la formación del autofagosoma; mientras que

al inhibir este proceso con el silenciamiento de ATG7 disminuyeron los niveles de LC3II. Con ello se concluyó que se estandarizó la inhibición genética de la autofagia por medio de un sistema lentiviral de shRNA en diversas líneas celulares de cáncer de mama. Además, se determinó que los diferentes subtipos de cáncer de mama tienen una sensibilidad distinta a inhibición de la autofagia y que, dentro de un mismo subtipo de cáncer de mama, existen distintas sensibilidades a la inhibición de este proceso.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Cáncer de mama*

1.1.1 *Definición*

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y descontrolado de células del epitelio de los conductos o lobulillo mamarios y que tiene la capacidad de diseminarse (Consejo de Salubridad General, 2009).

La mama está constituida por múltiples lóbulos y lobulillos en los que se produce la leche, conectados entre sí por los conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón. También contiene vasos sanguíneos cuya función es proporcionar sangre a la glándula y vasos linfáticos, que son los encargados de recoger la linfa. Además, está rodeada de tejido graso que proporciona consistencia y volumen a la mama, como se muestra en la figura 1. La mayoría de las neoplasias surgen en el interior de los ductos debido a la transformación clonal de una célula epitelial, infiltrando en una fase posterior los conductos. Su crecimiento puede producirse localmente, por vía linfática y hematógena a través de los vasos sanguíneos (Yustos, Angulo, & Soto, 2017).

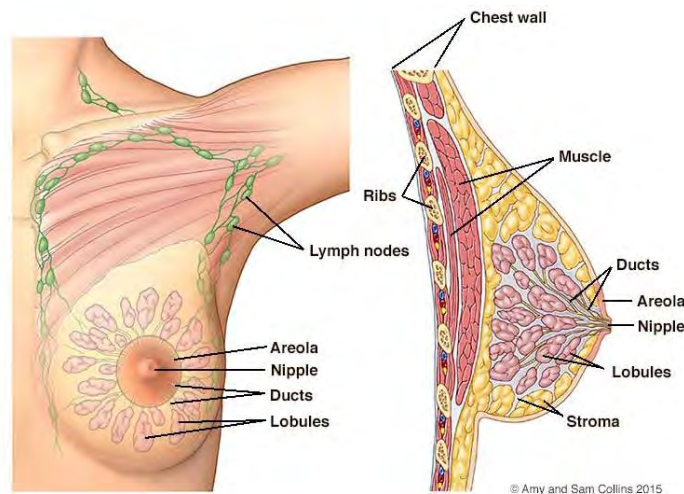


Figura 1. Anatomía de la mama normal. La mama femenina está compuesta de lóbulos (o glándulas mamarias), conductos que unen los lóbulos con el pezón y otros diversos tipos de tejido como lo son los de tipo adiposos, fibroso o linfático. De lado izquierdo se muestra la anatomía de la mama por la vista anterior; del lado derecho se muestra la vista lateral de la mama (modificado de Collins, 2015).

1.1.2 Epidemiología

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 24.2% de todos los cánceres femeninos, siendo considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los padecimientos predominantes a nivel mundial. De acuerdo a los datos reportados en el 2018 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en la población femenina alrededor del mundo, con cerca de 626 679 decesos debido a esta causa. El cáncer mamario representa el 11.6.% de los nuevos casos de cáncer, tanto en hombres como mujeres, y sólo lo supera el cáncer de pulmón (GLOBOCAN, 2018).

En cuanto a la magnitud actual del cáncer de mama en México, a partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. En el año 2010 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en los últimos 20 años (Cárdenas Sánchez et al., 2015). Datos más recientes reportados en el 2018, indican que el 27% de la población femenina mexicana padece esta patología y alrededor de 6 513 pacientes mueren a causa de esta enfermedad (GLOBOCAN, 2018). A partir del 2014 hasta la fecha, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) destacó que el cáncer de mama es la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos entre las mujeres mayores de 20 años de edad, mostrando incrementos con la edad (hasta los 64 años de edad), al pasar de 7.43 en el grupo de 20 a 29 años (por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad) a 218.24 en el grupo de 60 a 64 años de edad, confirmándose como el

tumor maligno de mayor impacto en su salud. De igual manera, es la segunda causa de mortalidad en las mujeres comprendidas en este rango de edad por tumores malignos, siendo la primer causa de muerte el cáncer gástrico (Castrezana Campos, 2017; INEGI, 2017). En nuestro país, el cáncer de mama se diagnostica en promedio a los 53 años de edad, lo que representa casi una década menor en comparación con Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa, en donde el promedio está alrededor de los 60 años (Cárdenas Sánchez et al., 2015).

El riesgo de padecer esta enfermedad es superior en las mujeres de países con nivel socioeconómico alto, pero el riesgo de morir por ella es mayor entre las mujeres que habitan países pobres, debido a un menor acceso a los servicios de salud para la detección temprana, tratamiento y control. Un programa de detección y control efectivo del cáncer de mama implica un modelo de atención que asegure el diagnóstico temprano y adecuado de todas las mujeres con síntomas clínicos o imágenes anormales en la mastografía (Cárdenas Sánchez et al., 2015).

1.1.3 Clasificación

Agrupar tumores en clases o entidades es importante por varias razones. En el manejo clínico, la categorización de los tumores es una herramienta para decidir o estandarizar el tratamiento y la atención del paciente, así como para la realización de ensayos clínicos en los que se evalúa la respuesta al tratamiento. Del mismo modo, se necesitan subtipos funcionales en estudios epidemiológicos para aprender más sobre los mecanismos en el desarrollo y evolución del tumor durante el tratamiento con un enfoque en la respuesta y la resistencia (Russnes, et. al., 2017).

La clasificación histológica se basa en la anatomía de la glándula mamaria. La mayoría de los tumores malignos de la mama surgen en el epitelio de los conductos y se denominan carcinomas; estos se clasifican fundamentalmente en dos grupos: *in situ* e infiltrantes o invasivos (Yustos et al., 2017).

- Los carcinomas *in situ* se caracterizan por el hecho de que las células tumorales no sobrepasan la membrana basal, por lo que no invaden el estroma adyacente.
- Los carcinomas infiltrantes, las células tumorales invaden el estroma circundante y pueden metastatizar; este subtipo es el más frecuentemente diagnosticado en España.

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasivo (del 70-80%). Los carcinomas de mama restantes se clasifican en tipos especiales según el patrón de crecimiento dominante: tubular, lobulares, cribiformes, mucinosos o medulares (Yustos, et al., 2017).

Por otra parte, una de las clasificaciones más importantes para el cáncer de mama es a través de inmunohistoquímica (IHC), organizándose en tres grupos principales (Cárdenas Sánchez et al., 2015):

- Positivo a los receptores hormonales (de estrógenos y progesterona).
- Positivo para receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2).
- Triple negativo.

Más del 75% de los cánceres de mama expresan el receptor de estrógeno (RE) y/o el receptor de progesterona (RP), y estos marcadores tienen tanto valor predictivo como

pronóstico. Aproximadamente del 10% al 15% de los cánceres de mama también expresan la proteína receptora HER2/erbB2/neu, un receptor de tipo tirosina cinasa que participa en la regulación del crecimiento celular. En población mexicana, la frecuencia en promedio de subgrupos definidos por estos marcadores es la siguiente: receptores hormonales positivos 60%, HER2 positivos 20.4%, y triples negativos 23.1% (Cárdenas Sánchez et al., 2015).

Existe otra clasificación que hace referencia a las características moleculares del cáncer de mama; esta clasificación se basa en patrones de expresión de diversos genes y se agrupa en dos categorías importantes, dependiendo del estado del receptor de estrógenos (RE): RE+ y RE-, con un total de 5 subtipos (Russnes et al., 2017).

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama (Russnes et al., 2017; Yustos et al., 2017).

Grupo de cáncer de mama	Subgrupo	Características
RE positivos (RE+) Expresión de genes de células epiteliales luminales de mama	Luminal A	Mayor expresión de RE.
	Luminal B	Menor sensibilidad a la terapia endócrina, peor pronóstico. Incluye también tumores HER2+, alta expresión de genes involucrados en mitosis y proliferación celular.
RE negativos (RE-)	Basal	Tumores RE-, RP- y HER2-. Expresión de genes de células mioepiteliales/basales: citoqueratinas basales.
	Enriquecido en HER2	Alta expresión de genes relacionados con HER2, asociado a marcadores de mal pronóstico: alteraciones en genes de angiogénesis, proteólisis, enzima topoisomerasa II α .

Normal like		Tumores con expresión similar a los patrones encontrados en muestras de tejido mamario sano.
--------------------	--	--

1.1.4 Etiopatogenia

La etiología del cáncer de mama es multifactorial y en gran medida desconocida. En su patogenia molecular se identifican diversas alteraciones genéticas que dan lugar a células somáticas malignas con un alto potencial de invasión local y de metastatizar. Este proceso puede iniciarse por una serie de carcinógenos químicos y ser promovido por varios factores ambientales y fisiológicos (Yustos et al., 2017).

Existen factores de riesgo que pueden aumentar la posibilidad de una persona de padecer cáncer de mama, entre los cuales se mencionan los siguientes:

- Biológicos (Cárdenas Sánchez et al., 2015; Yustos et al., 2017)
 - Edad y género: este tipo de cáncer es más frecuente en mujeres que en hombres (menos del 1% de los casos) y su incidencia aumenta con la edad hasta los 50-60 años.
 - Antecedente personal o familiar de cáncer de mama en madre, hijas o hermanas; las pacientes que han padecido un cáncer de mama tienen un riesgo aumentado (2 a 6 veces) de desarrollar un segundo cáncer primario en comparación con la población general, sobre todo en aquellas mujeres que lo tuvieron a una edad precoz. Respecto a la historia familiar, solo el 10% de las enfermas tienen antecedentes familiares, duplicándose el riesgo cuando una mujer tiene un familiar de primer grado con esta enfermedad.
 - Factores genéticos: se estima que el cáncer de mama hereditario supone del 5 al 10% de los casos, conociéndose solo en una cuarta parte de los

pacientes el gen causante, siendo los genes más importantes *BRCA1* o *BRCA2*. Ambos son genes supresores de tumor y el ser portadores se asocia a un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (riesgo aumentado del 37 al 85%), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, vesícula biliar, estómago, entre otros.

- Factores hormonales: terapia hormonal sustitutiva (exposición prolongada a los estrógenos), así como terapia hormonal en la perimenopausia o posmenopausia por más de 5 años. De igual manera, se ha visto que ciertas píldoras anticonceptivas aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama.
- Antecedentes reproductivos (Cárdenas Sánchez et al., 2015; Yustos et al., 2017):
 - Nuligesta.
 - Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.
 - Menarquia temprana (antes de los 12 años).
 - Vida menstrual mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).
 - Menopausia tardía.
- Iatrogénicos o ambientales(Cárdenas Sánchez et al., 2015):
 - Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente al tórax; estas radiaciones son fundamentalmente durante la infancia y adolescencia.
 - Exposición a sustancias químicas que pueden ser carcinogénicas.
- Dieta y estilos de vida (Cárdenas Sánchez et al., 2015; CDC, 2018)
 - Alimentación rica en grasas, sacáridos y baja en fibra.

- Obesidad, principalmente en la posmenopausia; debido a los altos niveles de estrógenos circulantes.
- Sedentarismo.
- Consumo de alcohol mayor a 15 g/día.
- Tabaquismo.

1.1.5 Manifestaciones clínicas

La presentación más habitual es una masa indolora que descubre la paciente. Asimismo, pueden referir dolor y secreción por el pezón. Se debe sospechar una neoplasia de mama ante los siguientes signos:

- Masa dura fija o no a planos profundos con/sin retracción de la piel.
- Hinchazón de todo el seno o parte de él.
- Retracción del complejo areola-pezón
- Edema y eritema cutáneo con «piel de naranja»
- Adenopatías axilares o en fosa supraclavicular.

En las pacientes con metástasis (menos del 10% al diagnóstico), los síntomas más frecuentes son: disnea, dolor óseo, fracturas patológicas, dolor abdominal y neurológico, así como hepatomegalia o ictericia en la exploración en el caso de diseminación hepática. (American Cancer Society, 2017; Yustos et al., 2017).

1.1.6 Diagnóstico

Ante la sospecha de cáncer de mama debido a la detección de una anomalía localizada, las pacientes deberán someterse a un estudio de imagen seguido de una biopsia con la confirmación del diagnóstico a través de un estudio histopatológico antes de cualquier procedimiento quirúrgico definitivo (Consejo de Salubridad General,

2009). De igual manera, se puede realizar un diagnóstico temprano, tomando en cuenta las siguientes recomendaciones (Cárdenas Sánchez et al., 2015):

- Autoexamen mamario mensual a partir de los 18 años (7 días después de terminada la menstruación).
- Examen clínico mamario anual a partir de los 25 años.
- Mastografía anual de tamizaje en mujer asintomática a partir de los 40 años.
- El ultrasonido (US) mamario es el estudio de elección inicial en mujeres menores de 35 años con patología mamaria.

Existen diversas pruebas diagnósticas utilizadas en la clínica para la detección y confirmación de esta patología, las cuales se pueden agrupar de la siguiente manera (Consejo de Salubridad General, 2009):

- Estudios de imagen: mastografía, ultrasonido mamario y en casos especiales resonancia magnética.
- Biopsias: con aguja fina, biopsia con aguja de corte.
- Estudio histopatológico.
- Estudios complementarios: biometría hemática, tiempos de coagulación, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, receptores estrogénicos y progestacionales, etc.

Uno de los puntos importantes a considerar en el diagnóstico es el tamaño del tumor, ya que es el principal factor pronóstico de la existencia de metástasis ganglionares. Se ha observado que, a partir de los 5 cm, casi el 75% de las pacientes tiene ganglios axilares afectados y existe una relación lineal entre el tamaño y pronóstico, de manera

que este empeora a medida que aumenta el tamaño tumoral. De igual manera, la afectación axilar es el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama localizado. Se debe considerar tanto la presencia o no de metástasis axilares como el número de ganglios infiltrados y la existencia o no de extensión extracapsular. El grupo con el peor pronóstico es el que tiene 10 o más ganglios afectados, ya que en estas pacientes es habitual que la enfermedad recidiva a pesar de los tratamientos adyuvantes (Yustos et al., 2017).

1.1.7 Tratamiento

El abordaje terapéutico del cáncer de mama se basa en la cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapias biológicas.

Tratamiento quirúrgico

La cirugía es el tratamiento local de elección en el cáncer de mama. Además, aporta información pronóstica que permite ofrecer el mejor tratamiento adyuvante. El objetivo de la cirugía es extraer el tumor con márgenes de seguridad y analizar si hay o no afectación de los ganglios de la axila (Yustos et al., 2017).

Radioterapia

Es una terapia básica en el tratamiento del cáncer de mama tanto en estadios tempranos como en enfermedad metastásica; se emplea después de realizarse una cirugía conservadora o puede indicarse en pacientes que se les ha realizado una mastectomía. Por tal motivo, puede tener finalidad adyuvante a la cirugía para erradicar la enfermedad residual y, de esta forma, reducir la recurrencia local (mama o pared) y/o regional (ganglios) o paliativa para aliviar síntomas provocados por el cáncer de mama o las metástasis (Yustos et al., 2017).

Quimioterapia

La quimioterapia (QT) es uno de los tratamientos más importantes a nivel sistémico del cáncer de mama junto a la hormonoterapia. Se administra en tres escenarios: adyuvante a cirugía, neoadyuvante o prequirúrgica y en la enfermedad metastásica. En etapas tempranas, la QT adyuvante y neoadyuvante reduce significativamente el riesgo anual de muerte y de recidiva, tanto en pacientes premenopáusicas como posmenopáusicas. Esta terapia siempre está indicada en las enfermas con subtipo triple negativo y en las luminales en las que se han agotado las opciones de hormonoterapia o se necesita una respuesta rápida (Yustos et al., 2017).

En pacientes triple negativas, además del esquema estándar con taxanos y antraciclinas, ha de considerarse la inclusión de un platino, en especial en las enfermas con mutación del BRCA.

Hoy en día se considera que el estándar de quimioterapia es 3 a 4 ciclos de antraciclinas y 3 a 4 ciclos de taxanos ± trastuzumab en casos de tumores HER2+ antes de la cirugía. Después de cada ciclo de quimioterapia deberá valorarse la respuesta al tratamiento clínicamente; tras la administración de 3 a 4 ciclos, se recomienda evaluar la respuesta clínica y radiológicamente (mediante mastografía y/o US). Si existe respuesta efectiva se continuará el tratamiento neoadyuvante hasta completarlo, de lo contrario se puede considerar cambio de esquema de quimioterapia (taxanos↔antraciclinas) por 2 a 4 ciclos más; posteriormente determinar si es operable o no, y si no es así, continuar con tratamiento (quimioterapia) (Cárdenas Sánchez et al., 2015).

Hormonoterapia

El tratamiento hormonal adyuvante es uno de los pilares fundamentales para las pacientes con expresión de RE o RP. Si la paciente debe recibir quimioterapia, la hormonoterapia comenzará una vez que finalice aquella.

Para las pacientes premenopáusicas, se recomienda la administración de tamoxifeno considerado como el fármaco estándar para mujeres premenopáusicas o perimenopáusicas con receptores hormonales positivos o desconocidos. El tamoxifeno es un antiestrógeno no esteroideo que modula selectivamente los RE, ejerce su actividad por competitividad, inhibiendo la unión del estrógeno al receptor; la duración recomendada de este tratamiento es de 5 años (Cárdenas Sánchez et al., 2015; Godone et al., 2018; Yustos et al., 2017).

Para las pacientes posmenopáusicas, se les recomienda el uso de inhibidores de la aromatasa (IA), ya que estas pacientes producen estrógenos, mediante la conversión de andrógenos a estrógenos por la acción de la enzima aromatasa. El mecanismo de los IA es bloquear esta enzima, disminuyendo los niveles circulantes de estrógenos. En función de su mecanismo de acción, se clasifican en dos grupos (Yustos et al., 2017):

- a) Esteroideos, que se unen de manera irreversible a la aromatasa (exemestano)
- b) No esteroideos, cuya unión es potencialmente reversible (anastrozol y letrozol).

Terapias biológicas

Se define como terapia biológica a aquellos tratamientos en donde se hace uso de organismos vivos, sustancias procedentes de organismos vivos o versiones producidas en el laboratorio para tratar diferentes enfermedades. Para el caso de cáncer, algunas

de las terapias biológicas se enfocan en estimular al sistema inmunitario para que actúe contra las células cancerosas, y colectivamente son conocidas como “inmunoterapia”. Otro tipo de terapias biológicas tienen como blanco a las células cancerosas, tal es el caso de los anticuerpos. En general, las terapias biológicas se utilizan para tratar, ya sea el mismo cáncer o los efectos secundarios que puedan ocasionar otros tratamientos (National Cancer Institute, 2018).

En las pacientes con sobreexpresión de HER2, la QT puede administrarse junto a trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal dirigido al dominio extracelular de HER2, inhibiendo las vías intracelulares que controlan el crecimiento celular y la diferenciación. En combinación con la quimioterapia adyuvante ha permitido obtener beneficio tanto en la supervivencia libre de recaída como en la supervivencia global (Godone et al., 2018).

Recientemente, los enfoques inmunoterapéuticos se han dirigido tanto hacia la alta especificidad de la respuesta inmune adaptativa como a la memoria inmunológica. Los puntos de control inmunológico se centran en mecanismos que regulan la proliferación, la supervivencia y la actividad de las células citotóxicas, evitando así el daño hacia el hospedero. Un ejemplo de este tipo de terapia son los anticuerpos dirigidos contra el receptor PD-1 (muerte celular programada-1), tales como nivolumab, y pembrolizumab, los cuales están aprobados para algunos tipos de cáncer pero muchos otros están bajo evaluación. PD-1 es un receptor expresado en muchas células del sistema inmune; su ligando PD-L1, es ampliamente expresado no solo en células presentadoras de antígeno y linfocitos activados, sino también en células no linfoides en la periferia. La interacción entre PD-1 y PD-L1, suprime la respuesta de las células

T a través de diferentes mecanismos, tales como la inducción de la apoptosis de las células T o la mejora de las funciones de estas células (Godone et al., 2018).

1.2 Autofagia

El descubrimiento de los lisosomas por Christian de Duve hace más de 60 años marcó el comienzo de un nuevo campo de investigación. En el año de 1963, de Duve acuñó el término “autofagia” para referirse al suministro de material citoplasmático heterogéneo intracelular a la digestión lisosomal. Posteriormente, el Dr. Yoshinori Ohsumi estudió el proceso en levadura, identificando 15 proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) esenciales para llevar a cabo este proceso; tal labor fue reconocida por medio del Premio Nobel 2016 de Fisiología y su descubrimiento ha dirigido a la investigación de la autofagia en diversas áreas, considerando que este proceso cumple un papel importante en la salud y en la enfermedad (Dikic & Elazar, 2018).

La autofagia es la principal vía de degradación de organelos y proteínas dañadas o de larga vida, así como de material citoplasmático, permitiendo de este modo el reciclaje del material intracelular. Este proceso se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana denominadas fagóforos, los cuales, encapsulan componentes citoplasmáticos. El fagóforo se expande para generar una estructura denominada autofagosoma, que se encarga de transportar la carga secuestrada hacia un orgánulo degradativo, ya sea un lisosoma (en la mayoría de los eucariotas superiores) o una vacuola (para el caso de levaduras y plantas). Posteriormente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma o vacuola, en donde ocurre la degradación debido a la presencia de enzimas hidrolíticas, así como el reciclado del material invaginado para sostener el

metabolismo celular (Klionsky & Schulman, 2014; Maciel-Herrerías & Cabrera-Benítez, 2016; Wong & Cuervo, 2010).

Existen diferentes tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia, (Klionsky & Schulman, 2014; Parzych & Klionsky, 2014).

- Microautofagia: involucra la absorción directa de material citosólico por medio de invaginaciones o protuberancias de la membrana lisosómica para capturar el material citoplasmático; esta puede incluir organelos intactos.
- Autofagia mediada por chaperonas (AMC): difiere de la microautofagia y macroautofagia en que no utiliza estructuras membranosas para secuestrar carga, sino que utilizan chaperonas para transportar proteínas individuales directamente a través de la membrana lisosomal, por ejemplo, proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSC-70, *the 70 kDa heat shock protein*) a través de la interacción con el receptor lisosomal LAMP2A (proteína asociada a membrana lisosomal 2A); siendo un sistema de degradación de proteínas altamente complejo. Este tipo de autofagia es altamente específica, ya que reconoce un motivo pentapeptídico en común en todos los sustratos, bioquímicamente relacionado con KFERQ. Las proteínas diana que contienen este motivo, se despliegan a través de la acción de chaperonas citosólicas y se translocan directamente a través de la membrana lisosómica donde se degradan en su interior. La AMC degrada una amplia gama de proteínas, incluyendo ciertas enzimas glicolíticas, factores de transcripción y sus inhibidores,

proteínas de unión a lípidos y a calcio, subunidades del proteasoma y proteínas implicadas en el tráfico vesicular.

- Macroautofagia: referida como autofagia de aquí en adelante y en la cual se enfocará este trabajo, es una vía muy conservada para la degradación masiva que implica el secuestro de la carga citoplasmática y posteriormente transportarla al lisosoma para su degradación.

Si bien cada una es morfológicamente distinta, las tres culminan en la entrega de la carga al lisosoma para su degradación y reciclaje. Además, la autofagia también puede ser selectiva o no selectiva; la autofagia no selectiva es inducida por condiciones de estrés celular o inanición de nutrientes, mientras que la autofagia selectiva implica el secuestro de material citoplasmático específico, por ejemplo, la mitofagia, que se refiere a la eliminación específica de las mitocondrias dañadas por autofagia, proceso que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular (Bhat et al., 2018; Klionsky & Schulman, 2014; Parzych & Klionsky, 2014).

La autofagia se produce a nivel basal en todas las células eucariotas, pues su función más importante es regular la homeostasis celular, reciclando aminoácidos y monosacáridos a través de la degradación no selectiva de proteínas y macromoléculas endógenas. De igual forma, funciona como un proceso de control de calidad de las proteínas y los orgánulos, o como un sistema citoprotector al eliminar selectivamente el material citoplasmático potencialmente nocivo para la célula (Dikic & Elazar, 2018; Manent et al., 2017; Mathew, Karantza-Wadsworth, & White, 2007; H. Wang, 2013). Por otro lado, la autofagia actúa también como un proceso adaptativo, al ser inducida en respuesta a condiciones de estrés, como la privación de nutrientes, agotamiento de

factores de crecimiento, el estrés oxidativo, infecciones, alteraciones en la función de la mitocondria o la hipoxia, lo que permite a las células hacer frente a la privación transitoria de nutrientes o a los niveles más bajos de oxígeno con la finalidad de generar energía y permitir la supervivencia celular. Por lo tanto, la autofagia es considerada como un proceso homeostático y evolutivamente conservado que mantiene la biosíntesis celular. Curiosamente, se ha observado que las células también utilizan la autofagia como un mecanismo para secretar componentes citoplasmáticos (Dikic & Elazar, 2018; Ho et al., 2017; Wong & Cuervo, 2010; Yang, Chee, Huang, & Sinicrope, 2011).

A grandes rasgos, el proceso de la autofagia se lleva a cabo de la siguiente manera: la inducción de la autofagia da como resultado el reclutamiento de las proteínas ATG a una ubicación subcelular específica denominada sitio de ensamblaje de fagóforo (PAS) y la nucleación de una membrana de aislamiento que forma una estructura en forma de copa denominada fagóforo. Posteriormente, ocurre el alargamiento gradual de la membrana de aislamiento de forma curva dando como resultado la expansión del fagóforo en una esfera alrededor de una porción del citosol. Esta membrana de aislamiento eventualmente se sella en una vesícula de doble membrana, llamada autofagosoma, atrapando así el material citosólico engullido. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana lisosómica para formar un autolisosoma y esta fusión da como resultado la liberación de un cuerpo autofágico de membrana única en la luz lisosomal, que es seguida por la degradación del cuerpo autofágico junto con su carga citosólica por las enzimas hidrolíticas lisosomales para el reciclado de los componentes celulares (Dikic & Elazar, 2018).

1.2.1 Maquinaria de la autofagia

La autofagia está controlada por un conjunto de más de 30 genes, conocidos como “genes relacionados a la autofagia” (genes ATG); sus productos proteicos, o proteínas ATG, se organizan en complejos funcionales que regulan cada uno de los pasos de la autofagia. Típicamente se divide en distintas etapas: iniciación, nucleación del autofagosoma, expansión y elongación de la membrana del autofagosoma, cierre y fusión con el lisosoma y degradación de productos intravesiculares, como se observa en la figura 2 (Levy, Towers, & Thorburn, 2017).

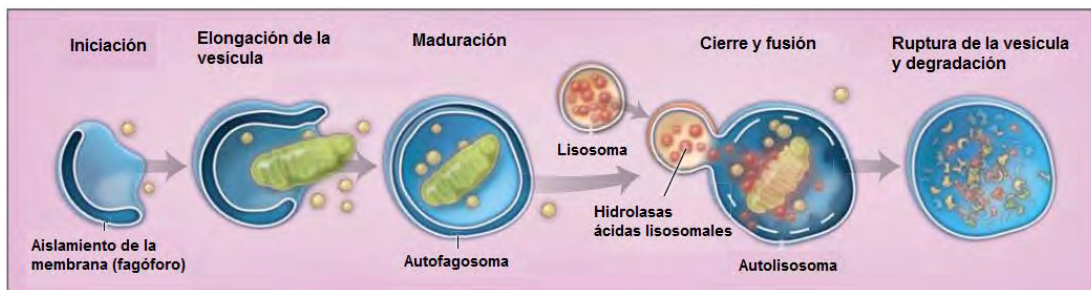


Figura 2. Pasos de la autofagia. La vía autofágica se lleva a cabo a través de diferentes fases, comenzando por la iniciación (formación de la membrana de aislamiento o fagóforo), alargamiento de la vesícula, maduración del autofagosoma y secuestro del material citoplasmático y la fusión del autofagosoma con el lisosoma. En la etapa final, el contenido del autolisosoma es degradado por las hidrolasas ácidas contenidas en el lisosoma y es utilizado para el reciclado metabólico (Modificado de Choi, Ryter, & Levine, 2013).

Las proteínas ATG se pueden clasificar en grupos dependiendo de la etapa en la que intervengan. La iniciación o también conocida como inducción, es la primera etapa de la autofagia. Tras la inducción de la autofagia en la levadura, la formación de autofagosomas comienza en un solo sitio perivacuolar llamado PAS. En cambio, en sistemas de mamíferos, la generación del autofagosoma se inicia en sitios múltiples a través del citoplasma en lugar de un solo PAS. Varios estudios sugieren que las estructuras asociadas al retículo endoplásmico llamadas omegasomas pueden servir

como sitios de iniciación en mamíferos (Parzych & Klionsky, 2014). El inicio de la formación del autofagosoma implica la generación de una membrana de aislamiento de múltiples fuentes, como el retículo endoplásmico, la membrana mitocondrial externa y la membrana plasmática. La generación de la membrana de aislamiento está regulada por el complejo de iniciación, denominado complejo Atg1/ULK1/2. En células de mamífero, el complejo ULK1 se compone de la cinasa de serina/treonina similar a Unc-51 (ULK1/2), la proteína 1 enrollable en espiral RB1CC1 (FIP200), ATG13 y ATG101 y éstas regulan la inducción del autofagosoma (Bhat et al., 2018; Dikic & Elazar, 2018). Durante la iniciación de la autofagia, el complejo ULK1 forma estructuras punteadas cerca del retículo endoplásmico y es ahí donde se forma el complejo de nucleación. A su vez, ULK1/2 activado fosforila los componentes del complejo de nucleación, denominado complejo PI3K de clase III (fosfatidilinositol 3-cinasa); este complejo está constituido por una PI3K de clase III (VPS34), Beclin-1, VPS15 y ATG14L. Este complejo se encarga de la fase de nucleación y su importancia radica en la producción del fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en el sitio de formación del autofagosoma, por acción de VPS34, quien dirige al fosfatidilinositol para generar PI3P en la membrana de aislamiento, que sirve como molécula de señalización para el reclutamiento de proteínas de unión a PI3P. Después de la iniciación, la membrana comienza a expandirse; en esta etapa, se denomina fagóforo, que es el compartimento secuestrante primario de doble membrana. A medida que el fagóforo se expande, la membrana se dobla para finalmente generar un autofagosoma esférico (Bhat et al., 2018; Dikic & Elazar, 2018; Klionsky & Schulman, 2014).

Posteriormente sigue la etapa del alargamiento o elongación de la membrana, en donde intervienen 2 sistemas de conjugación de proteínas de tipo ubiquitina: ATG5-ATG12 y ATG8/LC3-PE. Estos sistemas están compuestos de ATG12 y ATG8/LC3 (consideradas proteínas de tipo ubiquitina), ATG7 (enzima de tipo E1), ATG4 (proteasa), ATG3 y ATG10 (enzima de tipo E2), ATG5 y ATG16 (objetivos modificados). El complejo ATG5-ATG12, junto con ATG16 actúa para determinar el sitio de conjugación ATG8/LC3-PE; ATG12 se une covalentemente y de forma irreversible a ATG5 de una manera dependiente de ATG7 (enzima de activación E1) y de ATG10 (enzima de activación E2). Después de la conjugación de ATG12-ATG5, ATG16 se une a ATG5 de forma no covalente y se dimeriza para formar un complejo más grande, permitiendo de esta manera la asociación con el fagóforo y promoviendo la expansión de la membrana (Klionsky & Schulman, 2014; Parzych & Klionsky, 2014). En relación al sistema ATG8/LC3, la vía comienza con el procesamiento de pro ATG8/LC3 por la cisteína proteasa ATG4, al exponer un residuo de glicina en el extremo C-terminal de ATG8/LC3, esencial para la conjugación con fosfatidiletanolamina (PE). La forma procesada de LC3 con ATG4 se conoce como LC3-I, la cual se encuentra libremente difusa en el citoplasma. Los ATG8/LC3 procesados son activados por ATG7 (enzima de tipo E1) y lo transfiere a ATG3 (enzima de tipo E2). Finalmente, la glicina C-terminal de ATG8/LC3 se conjuga covalentemente con PE, obteniendo una forma lipidada anclada a la membrana denominada LC3-II. Para la conjugación eficiente de PE, el complejo ATG12-ATG5-ATG16 participa como una ligasa E3 para formar LC3-II. LC3-II está anclada a la membrana, pero puede escindir-se posteriormente mediante ATG4 para liberar LC3. Este mecanismo de regulación se conoce como desconjugación; sin embargo, no se

conoce a profundidad. Además de las proteínas ATG mencionadas que participan en la elongación de la membrana, ATG9 es otra de ellas. ATG9 es una proteína transmembranal que se encarga de ciclar entre los sitios periféricos y el PAS; asimismo se ha observado que controla el número de autofagosomas, por lo que se sugiere que ATG9 participa o regula la entrega de membranas de fuentes donantes a la expansión del fagóforo. Cabe mencionar que en tipos selectivos de autofagia, el reconocimiento de la carga ocurre durante la etapa de elongación. Entre algunas de las proteínas ATG que intervienen en este paso se encuentran: Atg19, que interviene en la selección del citoplasma a vacuola; Atg32, esencial para la mitofagia y Atg36, la cual actúa en la peroxifagia (Dikic & Elazar, 2018; Klionsky & Schulman, 2014; Parzych & Klionsky, 2014).

Tras la expansión y cierre del fagóforo, el autofagosoma experimenta maduración, proceso que implica la eliminación gradual de proteínas ATG de la membrana externa del autofagosoma y el reclutamiento de la maquinaria responsable de la fusión con el lisosoma, que incluye proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment Receptor*), tales como sintaxina 17 (STX17) y la proteína 29 asociada al sinaptosoma (SNAP29), proteína de membrana 8 asociada a la vesícula y al autofagosoma (VAMP8), y el complejo de fusión homotípica y clasificación de proteínas (HOPS), que regula el anclaje a la membrana para ayudar a la fusión mediada por SNARE (Dikic & Elazar, 2018). La fusión del autofagosoma con el lisosoma forma una nueva estructura denominada autolisosoma y para la formación de éste, los autofagosomas se desplazan hacia los lisosomas mediante su interacción con los microtúbulos (Parzych & Klionsky, 2014). Finalmente, una vez formado el autolisosoma, el contenido de esta estructura es

degradado por acción de las hidrolasas ácidas presentes. El eflujo de las macromoléculas producidas (principalmente aminoácidos y ácidos grasos) se vierte hacia el citosol, por medio de las permeasas de la membrana que incluyen a ATG22. Estas macromoléculas posteriormente se utilizarán como sustratos de metabolitos o como bloques para la biosíntesis, lo que lleva al cierre de un ciclo de retroalimentación energética. Por lo tanto, la autofagia monitoriza los requerimientos metabólicos de la célula, modulando el flujo autofágico de acuerdo con las demandas metabólicas de la célula (Bhat et al., 2018; Klionsky & Schulman, 2014).

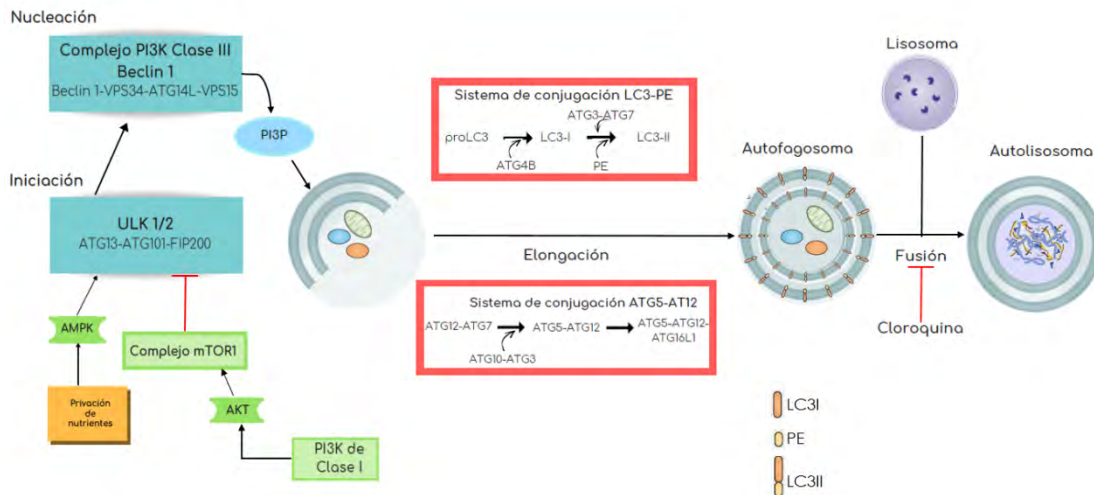


Figura 3. El proceso autofágico y algunos de sus principales reguladores. En condiciones ricas de nutrientes, mTORC1 suprime la autofagia al fosforilar e inhibir el complejo ULK1; en condiciones de inanición, mTOR se disocia del complejo ULK1 y la autofagia se activa. Activado ULK1/2 fosforila y activa los componentes del complejo de nucleación PI3K de Clase III, responsable de la formación de PI3P y del reclutamiento de proteínas de unión a PI3P. La elongación de la membrana autofagosómica esta mediada por dos sistemas de conjugación de proteínas de tipo ubiquitina: ATG5-ATG12 y LC3-PE (LC3II). Una vez que se forma el autofagosoma, se fusiona con los lisosomas para formar autolisosomas donde ocurre la degradación de su contenido (modificado de Cotzomi, et. al., 2018).

La vía autofágica se puede activar por diversos estímulos y uno de ellos es la presencia o ausencia de nutrientes. La señalización de nutrientes regula la formación del

autofagosoma a través de tres vías metabólicas principales: por medio de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). mTOR se encuentra en dos distintos complejos proteicos, mTORC1 y mTORC2, pero únicamente mTORC1 regula directamente a la autofagia. En condiciones normales, es decir, con una concentración adecuada de nutrientes, el complejo mTORC1 fosforila dos componentes principales del complejo ULK, ULK1 y Atg13, inactivándolos e impidiendo la formación de la membrana de aislamiento, inhibiendo así la autofagia. Por otro lado, la privación de nutrientes provoca la de-represión del complejo ULK1, a través de la desfosforilación de los sitios ULK1 a los que está unido mTORC1, provocando la disociación de ambas proteínas. Simultáneamente, ULK1 se autofosforila, seguido por la fosforilación de ATG13 y FIP200 (Bhat et al., 2018; Dikic & Elazar, 2018).

Otra de las vías metabólicas que regula la activación de la autofagia es a través de AMPK. El posterior agotamiento de los niveles de ATP como resultado de la privación de nutrientes también aumenta los niveles de ADP y AMP, detectada a través de la relación ATP:AMP por cinasas reguladoras de la homeostasis celular como lo son AMPK y LKB1. LKB1 activa la autofagia a través de AMPK mediante la inhibición de mTORC1, ocasionando la desfosforilación directa del sitio de activación ULK1 y de esta manera, restaurar los niveles de energía celular a través de la autofagia (Bhat et al., 2018; Dikic & Elazar, 2018).

1.2.2 Importancia de la autofagia

El proceso de autofagia tiene una gran importancia en condiciones normales. N. Mizushima desarrolló diversos modelos en ratones, en donde pudo observar el papel

de la autofagia en estos mamíferos. Mizushima generó ratones transgénicos que expresaban sistemáticamente la proteína verde fluorescente unida a LC3 (GFP-LC3), permitiendo la fácil visualización de los autofagosomas, y de esta manera el flujo autofágico; con este modelo determinó que durante el ayuno, cada órgano se caracteriza por tener diferencias tanto en cinética como en el grado de inducción de la autofagia (Ohsumi, 2014). De igual manera, desarrolló ratones mutantes deficientes en proteínas ATG, generando un *knockout* del gen *Atg5*, con lo cual demostró que la autofagia es esencial para la supervivencia durante la etapa de desarrollo neonatal en mamíferos. Estos ratones fueron capaces de producir descendencia a un ritmo normal, pero las crías murieron dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento debido a niveles bajos de aminoácidos y la presencia de un defecto de lactancia (succión de leche), así como defectos en la eliminación de cuerpos apoptóticos y en el desarrollo de corazón y pulmón, lo que demuestra que la autofagia es esencial para la supervivencia durante el desarrollo neonatal en los mamíferos (Ohsumi, 2014). En otros estudios, se ha visto el papel de diferentes genes *Atg* en murinos. Para ello se generaron ratones *knockout* para los genes *Atg*; estos ratones con fenotipo *knockout* para *Atg3*, *Atg7*, *Atg9* y *Atg16* se comportaron de manera similar a los *knockout* de *Atg5*. Sin embargo, los ratones *knockout* para *Becn1*, *Ambra1* y *FIP200* son incapaces de crear descendientes homocigotos debido su letalidad embrionaria temprana, lo cual sugiere que estos genes, además de participar en el proceso de autofagia, cumplen con otras funciones (Ohsumi, 2014).

Para conocer el papel funcional de la autofagia en un organismo completamente desarrollado, se generaron ratones adultos con delección condicional de *Atg7* en todo el

cuerpo. La ablación sistémica de *Atg7* causó daño en diferentes tejidos, así como susceptibilidad a la infección por *Streptococcus* y neurodegeneración, limitando la supervivencia de los ratones a 2-3 meses y ocasionándoles la muerte. Es importante destacar que, después de la inactivación de *Atg7*, los ratones no pudieron sobrevivir al ayuno durante 24 horas debido a una hipoglucemia fatal. Por lo tanto, los ratones adultos son menos dependientes de la autofagia que los recién nacidos, ya que pueden sobrevivir más tiempo en ausencia de autofagia pero este proceso es necesario en el adulto para sobrevivir al ayuno (Karsli-uzunbas, Guo, Price, & Teng, 2014).

Gracias a la investigación con ratones *knockout*, se ha dilucidado la importancia de las diversas funciones que cumple la autofagia, sugiriendo roles importantes de este proceso más allá del suministro de nutrientes. Como se sabe, en organismos pluricelulares, el proceso de división celular es más complejo y lleva más tiempo en comparación con eucariotas unicelulares, por lo que se debe tener un control de calidad intracelular más estricto. Un claro ejemplo de lo mencionado ocurre en las neuronas, las cuales se conservan durante toda la vida del organismo, teniendo la autofagia un papel fundamental en la eliminación de proteínas mal plegadas o dañadas, así como en las proteínas que tienden a formar agregados. No sólo en las neuronas se ha visto este control de calidad crítico, sino que también en otros tipos de células la autofagia es crucial: las células hepáticas dependen de la vía autofágica para la descomposición de metabolitos almacenados, mientras que las células β del páncreas utilizan a la autofagia para controlar los altos niveles de estrés del retículo endoplásmico (Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017; Ohsumi, 2014).

Por lo tanto, se ha determinado que la autofagia es necesaria para el mantenimiento del tejido adulto, especialmente para el mantenimiento neuronal en organismos completamente desarrollados y para la supervivencia del organismo en condiciones de ayuno. Estas evidencias corroboran que este proceso es trascendental para el desarrollo adecuado del organismo y como una importante vía de homeostasis para el mantenimiento celular.

1.3Autofagia y cáncer

Como se mencionó, la autofagia es un proceso catabólico altamente conservado que puede ser inducido bajo diversas condiciones del estrés celular, que previene el daño celular y promueve la supervivencia en caso de escasez de energía o de nutrientes. Por lo tanto, la autofagia tiene principalmente funciones citoprotectoras y necesita estar estrictamente regulada para responder a los diferentes estímulos que las células experimentan, lo que confiere la adaptación a un entorno en constante cambio. Ahora es evidente que la autofagia está desregulada en diversas patologías humanas, incluido el cáncer, y su modulación tiene un potencial como enfoque terapéutico (Dikic & Elazar, 2018).

La autofagia puede ejercer una influencia multifactorial sobre el inicio y la progresión del cáncer, así como sobre la efectividad terapéutica de esta enfermedad. En cáncer, se piensa que la autofagia tiene funciones tanto supresoras de tumor como promotoras de tumor. Evidencias científicas sustentan que tanto las funciones tumorales como las supresoras de tumor de la autofagia durante la progresión del cáncer dependen del tipo de tumor, el contexto y estadio en el que se encuentre (Galluzzi et al., 2015; Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017).

Antes de la aparición de un tumor, la autofagia actúa como un importante mecanismo supresor de tumores, mediante la reducción del estrés oxidativo, la inflamación y la inestabilidad genómica, a través de la eliminación de organelos dañados, como la mitocondrias que son fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno (EROS) potencialmente mutagénicas, y agregados proteicos que podrían promover la tumorigénesis (Galluzzi et al., 2015; Maycotte et al., 2014). Además de lo mencionado, se han propuesto otros mecanismos por los cuales la autofagia suprime la transformación maligna; uno de ellos es el mantenimiento de las funciones bioenergéticas normales de la autofagia, por su papel en el reciclado del material citoplasmático. Otro mecanismo hace referencia a la degradación de proteínas oncogénicas, como TP53^{mut} y p62. Si existieran defectos en la maquinaria de la autofagia o niveles bajos del proceso, esto podría facilitar la adquisición de características malignas por parte de las células sanas (Galluzzi et al., 2015)

Por otra parte, estudios realizados en modelos murinos sanos han descrito que la presencia de defectos en genes esenciales de la autofagia, ya sea en todo el cuerpo o en un tejido específico, de manera homocigota o heterocigota, induce una mayor incidencia de algunos tumores malignos o acelera la oncogénesis (Galluzzi et al., 2015).

La evidencia genética de que la autofagia puede prevenir la formación de tumores se obtuvo por primera vez por estudios enfocados a Beclin 1; se reportó que en ratones que carecían de una de las copias de *Becn1* desarrollaron linfoma, carcinoma hepatocelular y adenocarcinoma en pulmón de forma espontánea, esto debido a que la segunda copia del alelo seguía presente, funcionando *Beclin 1* como un supresor

tumoral haploinsuficiente. Asimismo, existen diversas moléculas que interactúan con Beclin 1; al estar alterado este gen y por lo tanto la proteína, estas interacciones se ven modificadas. Un ejemplo de esto es la interacción que tiene Beclin 1 con la oncoproteína BCL-2, lo que conduce a la supresión de la autofagia y a la oncogénesis (Galluzzi et al., 2015; Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017).

Además, se ha demostrado que en ratones con delección sistémica mosaico de *Atg5* se indujo el desarrollo de tumores benignos en el hígado. De igual manera, los ratones *knockout* en *Atg4* muestran una mayor susceptibilidad a los fibrosarcomas en un modelo inducido por carcinógenos, al igual que los carcinomas de pulmón impulsados por *KRAS^{G12D}* o *BRAF^{V600E}* con deleciones en *Atg5* o *Atg7* específicas a tejido pulmonar, así como las lesiones premalignas pancreáticas dirigidas por *KRAS^{G12D}*. También se ha reportado que las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en *Atg2B*, *Atg5* y *Atg9B* se presentan en carcinomas gástricos y colorectales, sugiriendo de esta manera además que los componentes de la maquinaria de la autofagia actúan como supresores de tumor en cánceres humanos (Galluzzi et al., 2015; Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017).

Una vez establecido el tumor, la autofagia ayuda a la supervivencia de células tumorales en respuesta a diversas condiciones de estrés, ya sean intracelulares o provenientes del microambiente, así como estrés inducido por la terapia, colaborando en su crecimiento tumoral, su capacidad anabólica, invasión y metástasis en las células, como resultado de una alta tasa de proliferación, privación de nutrientes y exposición a la hipoxia cuando existe una insuficiencia en la vascularización. A menudo no pueden mantener el suministro de nutrientes y se crea un ambiente hipóxico, de tal manera que

para prevenir la senescencia o la muerte, las células tumorales reprograman diversos mecanismos, utilizando la autofagia para poder sobrevivir en el microambiente tumoral (Galluzzi et al., 2015; Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017).

Asimismo, puede existir la posibilidad de que, una vez que se establezca el tumor, la respuesta eficiente del proceso autofágico se restaure, apoyando a la supervivencia, proliferación y crecimiento de las células cancerosas en presencia de condiciones adversas del microambiente (Fig 4). Sin embargo, aún no se ha establecido cómo se reconstituye la respuesta de la autofagia después de una fase inicial de inhibición. Como una posibilidad, se dice que la inestabilidad genética o epigenética que caracteriza a los tumores en progreso puede restaurar la autofagia en células específicas (Galluzzi et al., 2015)

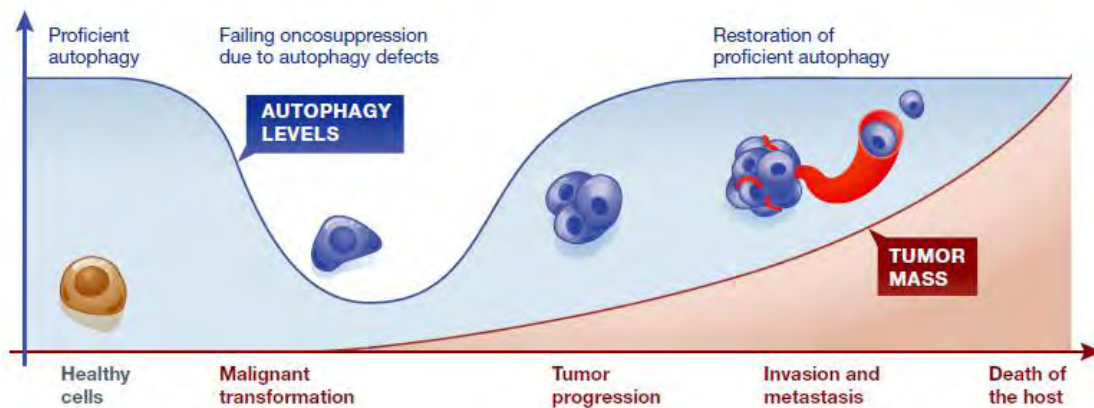


Figura 4. Autofagia en la transformación maligna y en la progresión tumoral. Las células sanas parecen estar protegidas de la transformación maligna por la respuesta eficiente de la autofagia. Por el contrario, la autofagia favorece la progresión tumoral y la resistencia a la terapia en una variedad de modelos. Por lo tanto, la transición de una célula sana hacia una neoplasia metastásica e insensible a la terapia puede implicar una pérdida temporal (pero no estable) en la eficiencia de autofagia (Galluzzi et al., 2015).

Por otro lado, se ha observado que la acumulación de p62 promueve la tumorigénesis. Así, los ratones con *knockout* condicional de *Atg7* en el hígado desarrollaron tumores múltiples en este órgano. Sin embargo, al tener un *knockout* simultáneo para p62 el efecto se revirtió, disminuyendo de esta manera el tamaño de los tumores. En células tumorales impulsadas por KRAS, p62 activa a Nrf2 y NF-kB estimulando las respuestas proangiogénicas y proinflamatorias, respectivamente, contribuyendo así a la progresión del tumor. El aumento del flujo autofágico, induce la degradación de p62, lo que conlleva a la disminución de las respuestas angiogénicas e inflamatorias (Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, 2017).

En diversos estudios, se ha descrito que la autofagia juega un papel importante en el tratamiento del cáncer, pues se ha visto que participa en procesos como la supresión tumoral, la supervivencia y la proliferación de las células tumorales (Maycotte et al., 2014). En lesiones premalignas, las evidencias sugieren que los potenciadores de la autofagia podrían prevenir el desarrollo del cáncer, por el contrario, en los cánceres avanzados, se ha sugerido como estrategia terapéutica la inhibición de la autofagia (Levy et al., 2017). Esta idea puede estar apoyada en datos que indican que los defectos en la maquinaria autofágica generalmente restringen la proliferación, diseminación y potencial metastásico en las células malignas (Galluzzi et al., 2015).

El estrés en las células tumorales se ve agravado por la alta demanda metabólica asociada con la rápida proliferación celular. En estos casos, la inducción de la autofagia por estrés en las células tumorales puede conducir a la resistencia al tratamiento y la latencia del tumor, con una eventual recurrencia y progresión del tumor. En los modelos preclínicos se ha observado que la inhibición de la autofagia por medios

genéticos o farmacológicos puede causar la muerte de las células tumorales. Además, los inhibidores de autofagia administrados en combinación con quimioterapia suprimieron el crecimiento tumoral y desencadenaron la muerte celular en mayor medida que la quimioterapia sola tanto *in vitro* como *in vivo* (Yang et al., 2011).

En estudios, se ha visto que las células cancerosas aisladas de tumores establecidos y sometidas a la inhibición genética o farmacológica de la autofagia son menos resistentes a estímulos exógenos que en su forma natural. De igual manera, se ha observado que los tumores deficientes en autofagia son más sensibles a diversos quimioterapéuticos y a la radioterapia que aquellas que no tienen defectos en esta vía. En efecto, estas células pueden experimentar senescencia; la senescencia es un estado de detención del ciclo celular mantenido, por lo tanto, las células no proliferan, pero pueden ser una de las causas de la recaída de la enfermedad al liberar diversas citocinas proinflamatorias y mitogénicas en el microambiente (fenotipo secretor asociado a la senescencia, SASP). Curiosamente, estas células son dependientes de autofagia para poder sobrevivir, y se ha demostrado que al exponerlas a inhibidores farmacológicos de la autofagia actúan de forma sinérgica con la quimioterapia, en modelos de linfoma que son susceptibles a SASP en respuesta al tratamiento, lo cual sugiere que la autofagia favorece la progresión de neoplasias y que los inhibidores farmacológicos de este proceso pueden tener efectos antineoplásicos en algunos entornos (Goldsmith, Levine & Debnath, 2017).

Con todas las evidencias que se tienen de la autofagia en cáncer, se sugiere que la supervivencia mediada por autofagia puede representar un impedimento importante para una terapia exitosa contra el cáncer y, por lo tanto, representa un blanco

terapéutico novedoso, para establecer la inhibición de la autofagia como un tratamiento adyuvante junto con la quimioterapia.

1.4Autofagia y cáncer de mama

De acuerdo a los trabajos mencionados anteriormente donde participa *Beclin 1*, se ha observado que cuando es eliminado monoalélicamente en muchos tipos de cáncer humano como el de ovario, mama y próstata, así como en tumores de mama humanos, se muestran niveles disminuidos de esta proteína en comparación con el tejido adyacente normal (Karantza-Wadsworth & White, 2007).

En estudios *in vivo*, los ratones *beclin1 +/-* son propensos a desarrollar tumores espontáneos. Sin embargo, al eliminar completamente *beclin 1 (beclin 1 -/-)*, los ratones mueren durante la embriogénesis, debido al papel importante que cumple esta proteína en el desarrollo embrionario. En células epiteliales mamarias de ratón inmortalizadas, se determinó que la pérdida monoalélica de *beclin 1* hace que sean susceptibles al estrés metabólico. Los defectos de autofagia también activan la respuesta de daño al DNA *in vitro* y en tumores de mama *in vivo*, promueven la amplificación génica, y en sinergia con la apoptosis defectuosa, parecen acelerar la tumorigénesis mamaria. Por lo tanto, la pérdida de la autofagia probablemente contribuya a la progresión del cáncer de mama al promover el daño y la inestabilidad del genoma, en forma de amplificación de genes que regulan positivamente el crecimiento y la proliferación celular (Karantza-Wadsworth & White, 2007).

De acuerdo a diversas evidencias, *beclin 1* se ha observado eliminado en aproximadamente el 50% de los carcinomas de mama esporádicos. Se sabe que *beclin 1* se encuentra al lado de *BRCA1*, un gen supresor de tumores cuya pérdida predispone

a la aparición de algunos tipos de cáncer de mama y ovario. Las evidencias sugieren que a pesar que de *beclin 1* se pierde en diversos tipos de cáncer de mama y ovario, este se elimina en conjunto con *BRCA1*, lo que concuerda con que la pérdida de *BRCA1* es la principal mutación que conduce a estos cánceres y se propone que *beclin 1* por sí solo no puede ser un supresor de tumor en este contexto. Asimismo, se ha demostrado que BCL-2 regula de manera directa a Beclin 1, inhibiendo a la autofagia en lugar de su función antiapoptótica, contribuyendo de esta forma a la tumorigénesis (Maycotte, 2014).

En modelos *in vitro*, especialmente en la línea celular MCF7, se han reportado defectos en Beclin 1. La restauración de los niveles de esta proteína y de la autofagia en las células MCF7 se asoció con la inhibición de la tumorigénesis inducida, disminuyendo la proliferación celular *in vitro* y en xenoinjertos *in vivo*. En los ratones *beclin 1 +/-*, no se observó un aumento en la incidencia de tumores mamarios, sin embargo, estos fueron susceptibles a linfomas y carcinomas de pulmón e hígado (Zarzynska, 2014).

La pérdida de *beclin 1* que se presenta en el cáncer de mama podría tener efectos importantes independientes de la autofagia a través de la interacción que tiene con Bcl-2. Bcl-2 es una proteína que regula la apoptosis y es considerada una proteína anti-apoptótica. *Bcl-2* está sobreexpresado en 50% - 70% de los cánceres, incluido el cáncer de mama y ejerce su función oncogénica al evadir la apoptosis. Se ha descrito una correlación inversa de la expresión de *beclin 1* y *Bcl-2* en el tejido de cáncer de mama, correlacionando la expresión de *Bcl-2* con el grado histológico, la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear, recuento mitótico, el receptor de estrógeno y la metástasis a distancia. Estas evidencias sugieren que la interacción entre Beclin 1 y

Bcl-2 podría ser importante para la tumorigénesis del cáncer de mama, ya que la pérdida o los niveles bajos de Beclin 1 aumentaría BCL-2 libre y por lo tanto una respuesta antiapoptótica (Maycotte, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la autofagia cumple un papel importante en la supresión tumoral. Sin embargo, se ha demostrado que la autofagia puede actuar como promotor de tumores en cáncer de mama. En algunos trabajos se estudió el papel de la autofagia en la tumorigénesis mamaria. En uno de ellos, se realizó un *knockout* condicional de la proteína FIP200 en el epitelio mamario en un modelo MMTV-PyMT inducido por la activación de Ras, Src y PI3K, observado la reducción de la tumorigénesis, metástasis y aumento en la supervivencia. El perfil de expresión génica de los tumores mamarios del estudio reveló un aumento en la expresión de genes de respuesta inmunitaria en los tumores deficientes de autofagia, lo cual sugiere que la eliminación de FIP200 promueve una respuesta inmunitaria antitumoral y contribuye a la supresión de la tumorigénesis y progresión mamaria. Con ello se sugiere que la adición a la autofagia podría ser un posible blanco terapéutico (Maycotte, 2014).

Otra de las evidencias importantes de la autofagia en cáncer de mama, es su papel como mecanismo de supervivencia en células tumorales y se ha visto que su inhibición, en combinación con otra terapia (generalmente quimioterapia), podría ser beneficioso. Sin embargo, se ha observado que las células cancerosas se comportan de diferente manera, al inhibirles este proceso. Esto pudo demostrarse en el trabajo de Maycotte y colaboradores, en donde se inhibió la autofagia en un panel de líneas celulares de cáncer de mama, encontrando que las líneas celulares de cáncer de mama del subtipo triple negativo son dependientes de la autofagia para sobrevivir aún en condiciones

ricas de nutrientes sin ningún tipo de estrés adicional, mientras que en otras líneas celulares es necesaria la autofagia sólo cuando están estresadas. Con esto, se determinó que la supervivencia en condiciones no estresadas se debe a la regulación de la autofagia por la actividad de STAT3 específica del subtipo celular triple negativo, sugiriendo que la dependencia de la autofagia representa una característica específica del subtipo celular donde la inhibición de este proceso será más efectiva. Además, se propone que la inhibición de la autofagia podría ser una estrategia terapéutica potencial para los cánceres de mama triple negativo, los cuales carecen de tratamiento dirigido (Maycotte et al., 2014).

Estudios acerca del papel de la autofagia en el desarrollo y progresión tumoral han llevado a la investigación con un enfoque terapéutico, ya sea activando o inhibiendo este proceso. Muchos fármacos que modulan la autofagia se han estado estudiando para poder aplicarlos en la clínica, tal es el caso de la cloroquina. La cloroquina (CQ) es un fármaco que se ha utilizado para tratar diversas enfermedades tales como artritis reumatoides, lupus eritematoso y malaria. Actualmente, debido a la capacidad que posee la CQ de bloquear a la autofagia, se ha generado un gran interés en el tratamiento contra el cáncer. Se sabe que la autofagia puede funcionar como un mecanismo de supervivencia en tumores sólidos, es por ello que se ha implementado el uso de la CQ en combinación con diversos quimioterapéuticos o radioterapia. A partir de diversas evidencias, la CQ es el fármaco más ampliamente usado para inhibir a la autofagia en modelos *in vitro* y muestra efectos sobre la muerte celular en combinación con agentes quimioterapéuticos. Asimismo, la CQ es el único inhibidor de la autofagia que se utiliza

en la clínica para tratar a los pacientes, y se ha visto que aumenta la efectividad de las terapias de cáncer (Maycotte et al., 2012; Zarzynska, 2014).

La terapia actual del cáncer de mama depende del tipo y etapa, y tradicionalmente consiste en un enfoque multivariado. De acuerdo con las evidencias mostradas, la inhibición farmacológica o genética de la autofagia se ha correlaciona con una mayor sensibilización de las células cancerosas a los efectos letales de diversas terapias contra el cáncer, lo que sugiere que la supresión de la autofagia podría representar una estrategia valiosa para tratamiento para el cáncer (Zarzynska, 2014).

1.5 *shRNA*

Se ha observado que el uso de shRNAs (del inglés *short harpin RNA* o RNA de horquilla corta), que imita la estructura de los miRNAs y que al ser expresados en vectores adecuados, es una estrategia eficiente para la inducción del RNAi o en este caso, del shRNA. Los shRNAs son sintetizados a partir de una sola hebra que codifica para la secuencia sentido (19 nt), seguido de 5-10 nt que forman la estructura de “rizo” y la secuencia anti-sentido complementaria de 19-29 nt. La hebra es insertada (clonada) dentro de un vector de expresión, el vector es introducido a la célula y el shRNA es transcrito mediante un promotor eucariótico de polimerasa. Los shRNAs son entonces procesados por Dicer, una endoribonucleasa de RNA bicatenario que actúa cortando el RNA de doble cadena para producir fragmentos cortos de doble cadena de alrededor de 20 nt, conocidos como siRNAs (del inglés *small interfering RNA*). Para incrementar la duración del silenciamiento por RNAi (del inglés *RNA*

interference), se desarrollaron vectores de expresión conteniendo promotores de RNA polimerasa para la transcripción de siRNA dentro de la propia célula. (Ortiz, 2009).

El mecanismo se basa en la degradación específica de la secuencia del mRNA del huésped a través del suministro citoplásmico de RNA de doble cadena idéntico a la secuencia blanco. Como se muestra en la figura 5, tras la introducción del material genético, se lleva a cabo la transcripción de los shRNAs en el núcleo y posteriormente, la horquilla entra en la vía de RNAi cuando es cortada por la enzima Dicer para generar siRNAs, los cuales son captados por el complejo de silenciamiento inducido por RNAi (RISC). RISC desenrolla el siRNA de doble cadena, separando en dos RNA de cadena simple: la cadena pasajera, la cual se degradará; y la cadena guía, que se cargará en este complejo con la ayuda de proteínas como Argonaute y proteínas de unión a RNA de doble cadena. El complejo RISC activado con la cadena de siRNA antisentido se dirige al transcrito de mRNA homólogo, con la finalidad de localizar la cadena guía en la molécula de mRNA complementaria e inducir la escisión por acción de Argonaute, que se encuentra en el núcleo de este complejo de silenciamiento inducido por RNA. El RNA escindido se degrada aún más por otras nucleasas endógenas (Moore, Guthrie, Huang, & Taxman, 2010; Under, S., George, H. & Boedeker, 2018).

La reducción en el nivel de transcripción resulta en niveles más bajos de la proteína objetivo, lo que resulta en cambios fenotípicos. El silenciamiento de genes se pueden analizar a nivel de transcripción de mRNA utilizando métodos como qRT-PCR o a nivel de proteínas mediante transferencia de Western, ELISA y métodos de cuantificación de proteínas basados en espectrometría de masas desarrollados más recientemente, como la tecnología AQUA (Under, S., George, H. & Boedeker, 2018).

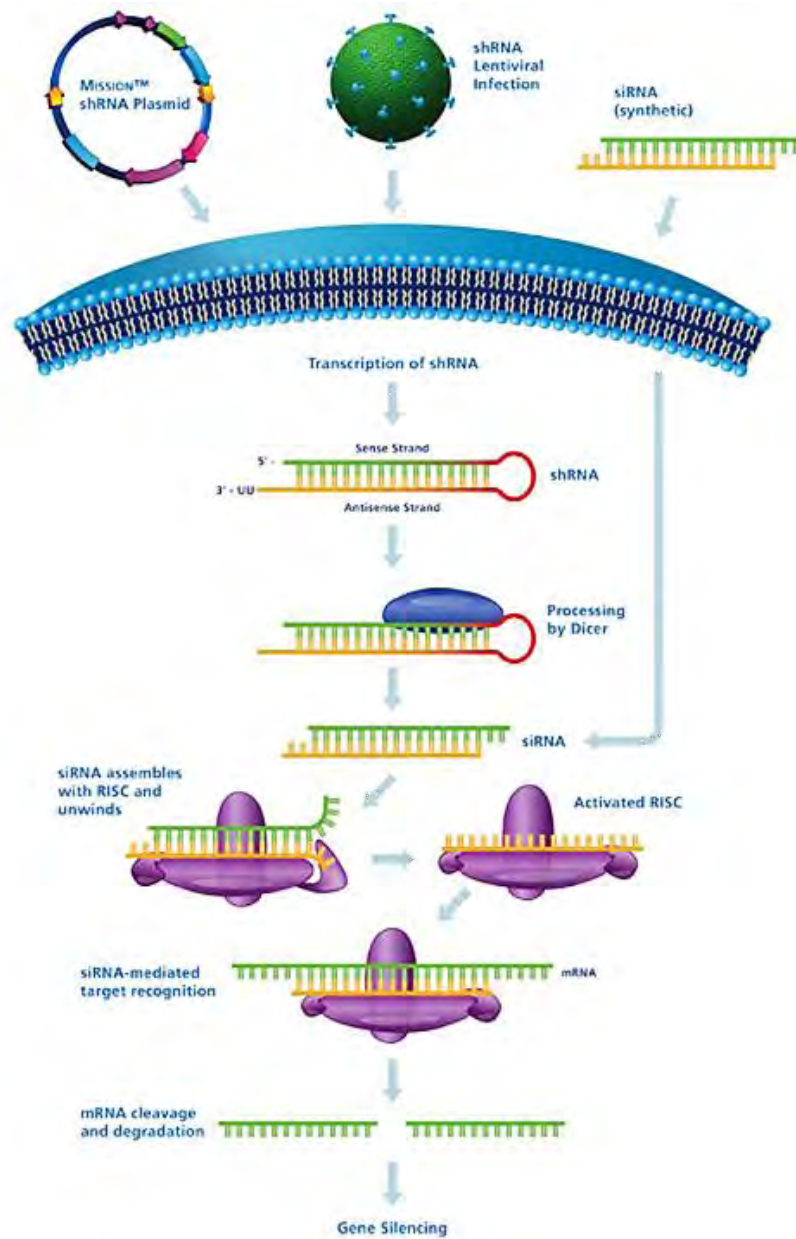


Figura 5. Procesamiento de un shRNA para el silenciamiento de un gen. Las células pueden transfectarse directamente con plásmidos de shRNA para un silenciamiento génico transitorio o estable, mientras que las partículas lentivirales de shRNA se pueden usar para transducir la línea celular de interés. Después de la transcripción del shRNA en el núcleo, la horquilla entra en la vía del RNAi al ser cortada por Dicer para generar siRNA, el cual es reconocido por RISC, que media la escisión del mRNA blanco para el silenciamiento de genes. El siRNA sintético puede ser directamente transfectado y entra en la ruta de RNAi cuando se ensambla con RISC (Under, S., George, H. & Boedeker, 2018).

2. Antecedentes

En diversos estudios se ha observado que la inhibición de la autofagia ya sea genética o farmacológicamente, promueve la muerte de células tumorales. De igual manera, el uso de inhibidores de la autofagia en combinación con quimioterapia suprimieron el crecimiento tumoral y desencadenaron la muerte celular en mayor medida que la quimioterapia sola tanto *in vitro* como *in vivo* (Yang et al., 2011).

En el laboratorio de Biología Celular (Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS), se han realizado experimentos inhibiendo a la autofagia farmacológicamente usando CQ a diferentes concentraciones, para evaluar la proliferación y muerte celular de diversas líneas de cáncer de mama, tanto de origen humano como de ratón.

La CQ es una base débil que atraviesa con facilidad las membranas celulares (al estar en pH neutro, no posee carga) y es catalogada como un agente lisosomotrópico, ya que se acumula en las vesículas citoplasmáticas ácidas. La acumulación de este fármaco dentro de los lisosomas eleva el pH de los mismos, inhibiendo a las enzimas lisosomales que requieren pH ácido y de esta manera evita la fusión del lisosoma con el autofagosoma, impidiendo así la formación del autolisosoma y por lo tanto la degradación del material invaginado (Luna & Sarmiento, 2016; Maycotte et al., 2012).

De acuerdo a datos no publicados (Salgado, J. & Maycotte, 2018), se observaron cambios en la proliferación celular y muerte celular al inhibir la autofagia utilizando CQ a diferentes concentraciones en líneas celulares de cáncer de mama de origen humano. Asimismo, en líneas celulares de cáncer de mama de origen murino, la inhibición farmacológica de la autofagia utilizando CQ promovió la muerte de las células tumorales (Cotzomi, I. & Maycotte, 2018, Tesis de doctorado en proceso)

Con lo anterior, se puede determinar que la inhibición farmacológica de la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama tiene un efecto tanto en la muerte celular como en la proliferación de células tumorales. A pesar de que la CQ inhibe la autofagia, no garantiza la inhibición total de este proceso, además de que al ser un tratamiento farmacológico, puede tener efectos independientes a la inhibición de la autofagia. Por lo tanto, en este trabajo se busca la inhibición específica del proceso. Esto se lograría de manera genética, al silenciar proteínas importantes para la autofagia, tales como ATG7 y Beclin 1 mediante el uso de shRNAs.

3. Justificación

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer que afecta a gran parte de la población femenina. En diversos estudios, se ha descrito que la autofagia juega un papel importante en el tratamiento del cáncer, pues se ha visto que participa en procesos como la supresión tumoral, la supervivencia y la proliferación de las células tumorales.

En el laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, se han realizado experimentos inhibiendo a la autofagia farmacológicamente usando CQ a diferentes concentraciones, para evaluar la proliferación y muerte celular de diversas líneas de cáncer de mama. Se ha observado que la inhibición de la autofagia farmacológicamente tiene un efecto tanto en la muerte celular como en la proliferación de células tumorales. A pesar de que la CQ inhibe la autofagia, no garantiza la inhibición total de este proceso, además de que al ser un tratamiento farmacológico, puede tener efectos independientes a la inhibición de la autofagia. Por lo tanto, en este trabajo se pretende inhibir este proceso de manera específica mediante la utilización de una técnica de manipulación genética lentiviral de shRNA que involucra el silenciamiento de proteínas ATG.

4. Objetivos

4.2 *Objetivo general*

Inhibir genéticamente la autofagia por shRNAs en líneas celulares de cáncer de mama.

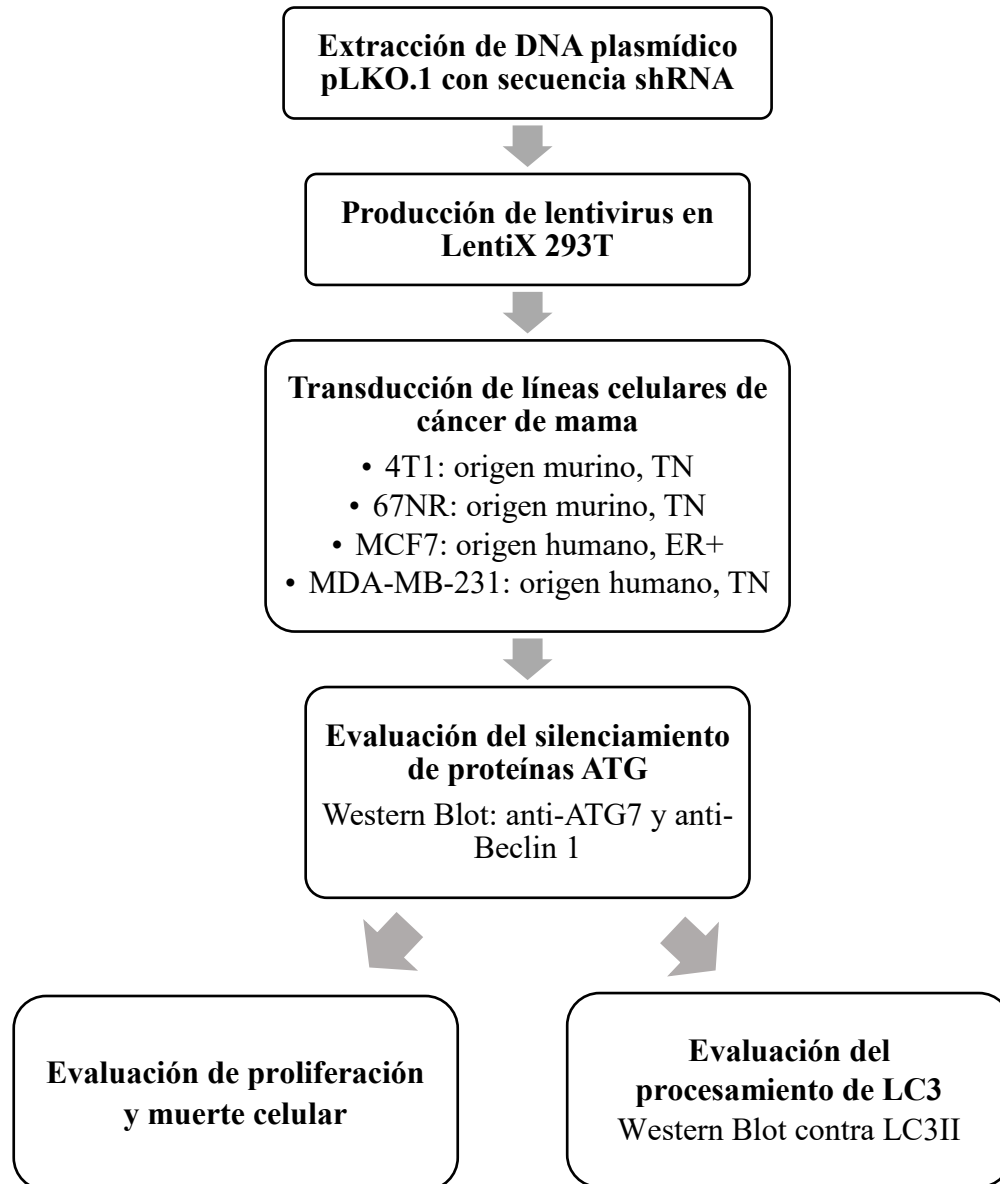
4.3 *Objetivos particulares*

1. Producir lentivirus de shRNAs contra proteínas relacionadas a la autofagia.
2. Comprobar el silenciamiento de proteínas relacionadas a la autofagia en líneas celulares de mama mediante Western Blot.
3. Evaluar la proliferación y muerte celular en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama tras la inhibición genética de la autofagia.
4. Evaluar cambios en el procesamiento de LC3 por medio de Western Blot en líneas celulares de cáncer de mama tras la inhibición genética de la autofagia.

5. Hipótesis

La inhibición genética de la autofagia en diferentes líneas celulares de cáncer de mama tendrá efectos sobre la proliferación y muerte celular así como en el procesamiento de LC3.

6. Diagrama de flujo experimental



7. Metodología

7.2 Transformación bacteriana

En un microtubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 100 μ L de bacterias de la cepa *E. coli* DH5a competentes, se añadió 1 μ L del plásmido de interés y se incubó por 10 min a 4°C; los plásmidos utilizados fueron hATG7 0.2 μ g/ μ L (TRCN 000007857) y mBecnl 1.1 μ g/ μ L (TRCN 0000087288). Como control positivo se utilizó el plásmido pLKO.1 no silenciante (SHC002, Sigma) y como control negativo TE pH 8.0 (1 μ L). Posteriormente, se realizó un choque térmico en termoblock a 42°C por 1 minuto 30 segundos y nuevamente se pasó a 4°C por 3 minutos. Se agregó 1 mL de LB sin antibiótico a cada tubo y se incubaron por 2 horas a 37°C a 250 rpm. Se tomaron 500 μ L del medio antes mencionado y se agregaron a placas Petri (placas LB/Agar/Ampicilina 1 μ L/1 mL de la marca CAISSON, A043-25GM) para el plaqueo con perlas de cristal, el cual se realizó moviendo de forma circular la placa esparciendo el cultivo bacteriano por todo el agar. Finalmente, se incubaron tapa abajo a 37°C toda la noche.

7.3 Extracción de DNA plasmídico por la técnica de Mini-prep

De las placas de LB/Ampicilina, se sembró 1 colonia en tubos con LB/Ampicilina con 5 mL de medio (1 μ L de ampilicina/ 1 mL de medio) y se incubaron toda la noche a 37°C a 250 rpm, un tubo por cada colonia diferente. Se centrifugaron 4 mL del cultivo a 4 000 rpm por 20 minutos y el 1 mL restante se almacenó en glicerol al 20% para cada uno de los cultivos bacterianos. Se resuspendió el pellet en 100 μ L de solución I estéril. Se añadieron 200 μ L de solución II recién preparada y se mezcló invirtiendo el tubo rápidamente. Después, se añadieron 150 μ L de solución III estéril (ver en Anexo

1 la preparación de las soluciones). y se mezcló agitando vigorosamente; se dejó incubando a -20°C por 30 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente; se transfirió el sobrenadante a un tubo microtubo Eppendorf nuevo, se agregó 1 μL de RNAsa y se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se precipitó el sobrenadante con 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C por 40 minutos; se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se enjuagó el pellet con 1 mL de etanol al 70% frío. Se invirtió el tubo para limpiar bien las paredes y se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el etanol y se dejó secar al aire por 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 μL de TE pH 8.0, se agregó 0.5 μL de RNAsa y se dejó a temperatura ambiente por 60 minutos. Se cuantificó el DNA plasmídico por medio de espectrofotometría utilizando un nanofotómetro.

7.4 Digestión enzimática por NotI

Se preparó la mezcla de reacción añadiendo 15 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL del buffer 10X FastDigest Green de Thermo Scientific, 2 μL de DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1 μL de la enzima, en este caso se utilizó NotI (Thermo Scientific, ER0591) añadiendo los reactivos en el orden mencionado. Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C en termoblock por 30 minutos.

7.5 Comprobación del DNA plasmídico extraído por electroforesis en gel de agarosa al 1%

Se preparó el gel de agarosa al 1%, disolviendo 0.2 g de agarosa en 20 mL de TAE 1x con ayuda de calor. Se dejó enfriar un poco la mezcla, se añadieron 2 μL de bromuro de etidio (PROMEGA, H5041) y se colocó en el molde para hacer el gel. Posteriormente, se llenó la cámara de electroforesis con TAE 1x. Se cargaron 5 μL de

cada una de las muestras en cada uno de los carriles; se utilizaron 2 μL del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Ladder (Thermo Scientific, SM0312) un control positivo (plásmido pLKO.1 no silenciante, digerido por la enzima NotI) y un control negativo (pLKO.1 no silenciante sin digerir) en carriles diferentes. Para el corrimiento de las muestras, las condiciones de trabajo fueron 80V por 45 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se reveló el gel en el transiluminador para observar el corrimiento de cada una de las muestras.

7.6 Extracción de DNA plasmídico por la técnica de Maxi-prep

Se preparó un cultivo bacteriano pequeño colocando en un tubo cónico Falcon estéril, 5 mL de LB con Ampicilina (CAISSON, A043-25GM y 5 μL del stock bacterias de interés y se incubó alrededor de 8 horas a 37°C a 250 rpm. Posteriormente, se tomaron 500 μL de este cultivo y se colocaron en 200 mL de medio LB con ampicilina, se dejó incubando a 37°C toda la noche con agitación (250 rpm). Se centrifugó el cultivo bacteriano por 20 min a 4 000 rpm en tubos cónicos Falcon de 50 mL, se eliminó el sobrenadante y se quitó cualquier residuo de medio aspirando con la punta de una micropipeta, el pellet debe quedar lo más seco posible. Posteriormente, se resuspendió el pellet de bacterias de un cultivo de 200 mL en 5 mL de Solución I, se añadieron 10 mL de solución II preparada recientemente, se cerró el tubo y se mezcló por inversión varias veces. Se mantuvo el tubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 7.5 mL de Solución III fría (4°C), se cerró el tubo y se mezcló por agitación varias veces (no deben quedar dos fases líquidas distinguibles). Se almacenó el tubo en hielo por 10 minutos; se debe formar un precipitado blanco floculento. Se centrifugó el lisado bacteriano a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C y se

filtró el sobrenadante por tres capas de gasa a un tubo de centrifuga, se exprimió la gasa para extraer todo el líquido posible. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien y se almacenó el tubo por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 4 000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante con cuidado, se invirtió el tubo para eliminar las últimas gotas de sobrenadante. Se enjuagó el pellet y las paredes del tubo con 200 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente con cuidado de que no se despegara el pellet. Se dejó escurrir el etanol y se removieron las gotas del líquido que quedaron adheridas a las paredes del tubo. Se colocó el tubo abierto, invertido en una hoja de papel por algunos minutos a temperatura ambiente para que el etanol se evaporara. Finalmente, se disolvió la pastilla de ácidos nucleicos en 1.5 mL de TE pH 8.0 estéril y se cuantificó el DNA plasmídico en el nanofotómetro.

7.7 Purificación del DNA plasmídico mediante precipitación con polietilenglicol.

Se transfirió la solución de ácidos nucleicos (1.5 mL) a un tubo de ultracentrífuga estéril, se añadió 1.5 mL de una solución de LiCl 5 M fría (4°C), se mezcló y se centrifugó la solución a 10 000 rpm por 4 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de ultracentrífuga de 50 mL, se añadió un volumen igual de isopropanol, se mezcló y se recuperaron los ácidos nucleicos del precipitado por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante con cuidado, se invirtió el tubo abierto para que escurrieran las últimas gotas del sobrenadante. Se enjuagó el pellet y las paredes del tubo con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se escurrió el etanol, se colocó el tubo invertido para que se evaporaran las últimas gotas de etanol. Se disolvió el pellet en 250 μ L de TE pH 8.0

que contenga RNAsa pancreática libre de DNAsas (20 µg/mL, añadir 2.5 µL del stock de 2 mg/mL por cada 250 µL). Se transfirió la solución a un microtubo Eppendorf de 1.5 mL y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se añadieron 250 µL de NaCl 1.6 M que contenga polietilenglicol (PEG 8000) al 13% (w/v), se mezcló bien y se dejó toda la noche a 4°C. Se recuperó el DNA plasmídico por centrifugación a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante por aspiración, se disolvió el pellet de DNA plasmídico en 250 µL de TE pH 8.0. Posteriormente, se realizó la extracción con fenol-clorofomo, añadiendo 250 µL de fenol saturado, se agitó bien y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la capa superior (acuosa) y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 250 µL de la mezcla de fenol:cloroformo, se agitó bien y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se tomó la capa superior (acuosa) y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 250 µL de cloroformo, se agitó bien y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirió la capa superior (acuosa) a un nuevo tubo, se añadieron 62.5 µL de acetato de amonio 10 M y se mezcló bien. Se añadieron 450 µL de etanol absoluto y se almacenó el tubo toda la noche a 4°C; se recuperó el precipitado por centrifugación a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante por aspiración, se añadieron 100 µL de etanol al 70% a 4°C, se agitó y centrifugó por 2 minutos a 10 000 rpm. Se resuspendió el pellet en 200 µL de TE pH 8.0 y se cuantificó con ayuda del nanofotómetro.

Consecutivamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar que el DNA plasmídico obtenido del protocolo de Maxi-prep era el deseado y evaluar la integridad del mismo. Para ello se llevó a cabo una digestión enzimática

utilizando la enzima NotI (Thermo Scientific, ER0591), siguiendo el mismo protocolo indicado en la sección 7.4.

7.8 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares: MCF7, positiva a receptor de estrógenos y MDA-MB-231, de tipo triple negativo y metastásica; ambas de origen humano. De igual manera se utilizaron 67NR y 4T1, ambas de tipo triple negativo y de origen murino. Para la producción de lentivirus se utilizaron las células Lentix 293T. Para el cultivo y mantenimiento de estas líneas celulares se usaron los siguientes medios: la línea celular MCF7 creció en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico al 1% e insulina al 0.1%; la línea celular MDA-MB-231 se creció en medio F12 suplementado con SFB 10%, adicionado con antibiótico 1%. Las líneas celulares 67NR, 4T1 y Lentix 293T crecieron en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico al 1%. Las líneas celulares fueron cultivadas en una atmósfera húmeda compuesta por 95% de aire/ 5% CO₂ a 37°C.

7.9 Producción de lentivirus

Se sembraron 500,000 células 293T en placas para cultivo celular de 100 mm (una placa por cada shRNA a utilizar), deben de estar a una confluencia cercana al 50-60% para la transfección. Al siguiente día, se preparó la reacción para cada shRNA a emplear, utilizando microtubos Eppendorf de 1.5 mL en el siguiente orden: 400 µL medio DMEM sin suero, 0.2 µg pVSV-G, 1.8 µg pRRE, 1.8 µg pRSV, 2.0 µg pLKO.1 NS, 2.0 µg pLKO.1 con secuencia de shRNA (Beclin 1 o ATG7); se mezcló bien con vórtex y se añadió polietilenimina (PEI) (Polysciences, Inc., 23966) 1 mg/mL en una proporción DNA:PEI, 1:3, se mezcló bien con vórtex a la velocidad más alta por 15

segundos. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 15 minutos sin moverlos. Se reemplazó el medio de las células 293T con 6 mL de DMEM con suero; se añadió el contenido de cada uno de los tubos a cada placa de cultivo con punta azul por goteo y se agitó la placa con cuidado de manera orbital. Se incubó a 37°C en la incubadora.

Al tercer día, por la mañana se removió el medio con los complejos de transfección y se reemplazó con medio fresco con suero (6 mL por placa) cuidado de no despegar las células 293T. Al día siguiente, se recolectó el medio de las células 293T en tubos cónicos Falcon de 50 mL y se reemplazó con medio fresco (6 mL/placa); se almacenaron los virus a 4°C. Al quinto día, se recolectó el medio de las células 293T en el mismo tubo de la recolección de 24 h y se desecharon las células. Para eliminar residuos de células 293T, se congelaron los tubos a -80°C aproximadamente 1 hora, se añadió bromuro de hexadimetrina HB (SIGMA, 107690) (concentración final 8 ug/mL, 0.8 uL/mL del stock 10 mg/mL), se mezcló con vórtex, se alicuotó en microtubos Eppendorf de 1.5 mL (alícuotas de 1 mL) y se congelaron a -80°C.

7.10 *Transducción de líneas celulares de cáncer de mama*

Se sembraron las células a transducir en placas de 6 pozos: para la línea MCF7 se sembraron 60 000 células/pozo; para la línea MDA-MB-231 se sembraron 40 000 células/pozo; para las líneas 4T1 y 67NR, se sembraron 30 000 células/pozo. Se sembraron dos pozos adicionales para control y control + puromicina. Una vez que las células se pegaron al plato, se cambió el medio a 1 mL de medio para cada línea celular con suero, y se incubó 1 h con HB (concentración final 8 µg/mL, 0.8 µL/mL del stock 10 mg/mL). Se añadieron 0.5 – 1 mL de virus con HB (dependiendo de la línea celular); para las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, se les colocó 1 mL de virus, mientras

que para las líneas celulares 67NR y 4T1, se les añadió 0.5 mL de virus. Al siguiente día, se cambió el medio y se reemplazó por medio fresco con suero (3 mL). Se comenzó la selección con puromicina (SIGMA, P8833), por 3 días (como se muestra en la tabla 1). Las concentraciones de puromicina varían para cada línea celular, debido a la sensibilidad que presenta cada una a este antibiótico; estas concentraciones fueron previamente estandarizadas en proyectos anteriores. Después de la selección, las células control sin transducir y con puromicina deben estar muertas. A partir del día 3-4 después de la transducción, las células se utilizaron para los experimentos.

Tabla 2. Concentraciones de puromicina para líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	Puromicina (selección, µg/mL)	Puromicina (mantenimiento, µg/mL)
67NR	5	2
4T1	2	1
MCF7	1	0.5
MDA-MB-231	0.5	0.2

7.11 *Evaluación del silenciamiento de la autofagia por medio de Western blot*

A. Preparación de la muestra para el Western blot

De las células que se transdujeron (tanto la que incluye el shRNA como el no silenciante) se despegaron, colocando 250 µL de tripsina e incubándose a 37°C por 5 minutos (en el caso de las líneas celulares de origen humano) y 15 minutos (en el caso de las líneas celulares de ratón). Después se añadieron 500 µL de PBS 1x, se centrifugaron las células a 2500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se preparó el buffer RIPA + inhibidores de proteasas (Complete, ROCHE, 11697498001) añadiendo 1 µL de inhibidores por cada 24 µL de RIPA (ver Anexo 1 para la

preparación de esta solución). Se añadieron 20-50 μL RIPA + inhibidores a cada tubo dependiendo del pellet de células. Posteriormente, se sometieron las muestras a sonicación, por 2 ciclos: el primero de 5 segundos y el segundo de 3 segundos, manteniendo en todo momento las muestras a 4°C . Finalmente se centrifugaron los tubos a 10 000 rpm por 5 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante para transferirlo a un tubo nuevo, en donde se encontrarían las proteínas totales. Nota: Todo el tiempo se debe mantener en frío a las proteínas (4°C), así como el RIPA + inhibidores.

B. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

Para la realización de la curva, en una placa de 96 pozos se colocaron 100 μL de H_2O desionizada desde el pozo A hasta el H por triplicado. Los pozos A se designaron para el blanco, en los pozos B se colocaron 16 μL del stock de albúmina (SIGMA, A3059, 1 mg/mL) y se añadieron otros 100 μL de H_2O desionizada, se mezcló bien y se realizaron las diluciones, añadiendo 100 μL del pozo B al C, mezclando y pasado 100 μL del pozo C al D, y así sucesivamente; de esta manera las concentraciones de la curva fueron de 8-0.125 mg/mL. Para los pozos correspondientes a las muestras, se añadió 1 μL de muestra, de igual manera por triplicado. Posteriormente, se añadieron 100 μL del reactivo de Bradford 2x (ver Anexo 1) en cada uno de los pozos, tanto en los de la curva de albúmina como en los de las muestras. Finalmente, se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro “Biotek Sinergy” a una longitud de onda de 595 nm, se obtuvieron las concentraciones de la curva de albúmina y de cada una de las muestras problema a partir de la ecuación de la recta.

C. Preparación del gel de poliacrilamida

Se colocaron los vidrios limpios en los racks; posteriormente se añadió agua entre los vidrios para ver si existía o no fuga. Se prepararon dos diferentes geles para este tipo de electroforesis, el gel separador y el gel concentrador. El gel separador se utilizó a una concentración del 15%, para ello se añadió 2.4 mL de H₂O desionizada, 4.7 mL de acrilamida, 2.5 mL buffer Tris-HCl pH 8.8 y 100 µL de SDS 10%, se mezclaron los reactivos y se agregaron 50 µL PSA 10% (SIGMA, A3678-25G) y 5 µL TEMED (SIGMA, T9281-25ML) a la solución de preparada anteriormente y se mezclaron. Se vertió la solución suavemente entre los vidrios lo más rápido posible, evitando la formación de burbujas. Posteriormente, se añadió una delgada capa (1-2 mm) de etanol (también puede ser agua destilada), depositada muy suavemente sobre la mezcla y se dejó que polimerizara, se decantó el exceso de líquido de la superficie. Posteriormente, se preparó la solución del gel concentrador, a una concentración del 6%, añadiendo 5.4 mL de H₂O desionizada, 2 mL de acrilamida, 2.5 mL buffer Tris-HCl pH 6.8, 100 µL de SDS 10% y por último se añadieron 50 µL de APS 10% y 10 µL TEMED, se mezcló y se vertió la solución entre los vidrios hasta que la parte superior de la placa corta estuviera lleno, posteriormente se colocó el peine.

D. Preparación de las muestras para Western Blot

Se realizaron los cálculos para añadir 40 µg de proteínas para cada muestra; en microtubos Eppendorf de 0.6 mL se colocaron los µL indicados para cada una de las muestras (dependiendo de su concentración). Se añadió el mismo volumen de buffer de carga 2x (ver Anexo 1 para preparación de solución) y se hirvieron todos los tubos

a 97°C por 5 minutos. Después del tiempo indicado se sacaron las muestras y se colocaron en hielo.

E. Carga de muestras

Se colocaron los geles en los casetes y estos a su vez, se colocaron en la cámara de corrida. Se llenó la cámara superior con buffer de corrida (Tris-glicina-SDS, ver Anexo 1) justo debajo el borde de la placa exterior. Se quitaron los peines de cada uno de los geles y se enjuagaron los pozos con el buffer de carga para retirar cualquier residuo de acrilamida que pudiera haber quedado en el pozo. Una vez preparadas las muestras, se cargaron colocando cada una en un pozo diferente; en el primer pozo se coloca el marcador de peso molecular. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 volts por 2 horas.

F. Electrotransferencia a membranas de PVDF

Se recortaron las membranas de PVDF (Millipore, IPVH00010) de un tamaño de 4x9 cm. Para activar las membranas, se pusieron en un recipiente con metanol y se colocó una tapa para evitar que se volatilizara. Los filtros se humedecieron en un recipiente con buffer de transferencia. Se retiró el gel de la cámara de electroforesis, y se colocó en buffer de transferencia. Una vez limpia la plancha del Transblot, se colocó en el siguiente orden: filtro, membrana, gel y filtro, evitando la formación de burbujas. Se realizó la electrotransferencia a 14 volts por 45 min.

G. Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos

El bloqueo se realizó con leche al 5% (Svelty 0% grasa, NESTLÉ). Posteriormente se dejó incubando el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación, para ello se

utilizaron los anticuerpos anti-ATG7 (Cell signaling, 8558, 1:500), Beclin-1 (Cell signaling, 3738, 1:1000) y β -Actina (SIGMA, A5441, 1:5000) usado como control de carga, todos se prepararon en BSA al 5%. Una vez incubado con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.05%, cada uno de 10 minutos. Después de los lavados, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario por 2 horas; los anticuerpos utilizados fueron anti-conejo (Cell signaling, 7074, 1:20 000) para la proteína de Atg7 y Beclin-1, y anti-ratón (SIGMA, A0545, 1:20 000) para β -actina, ambos preparados en leche al 5%. Transcurridas las 2 horas, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.05%, de 10 minutos cada uno. Ya lavadas las membranas, se revelaron con Immobilon™ Western (Millipore, WBKLS0500), reactivo que contiene una solución de luminol y otra de peróxido, el cual se preparó 1:1 de cada una de las soluciones en un tubo y se mezcló por inversión. Se añadieron de 300-500 μ L de la mezcla anterior para cada una de las membranas del lado en donde se encuentran las proteínas, dejándolo incubar durante 5 minutos, se añadieron 500 μ L de la mezcla mencionada en la placa del transiluminador y se colocó la membrana en el transiluminador Li-Cor para escanear la membrana y observar el resultado.

7.12 Ensayo de proliferación celular mediante microscopía en tiempo real con el equipo IncuCyte ZOOM

Se sembraron 3000 células/pozo por triplicado, en placas de 96 pozos por cada una de las condiciones (control, es decir, no silenciante y células a las que se les inhibió la autofagia), para cada línea celular. Se dejaron incubando por 4 horas a 37°C para que se adhirieran al plato y posteriormente se midiera su proliferación por 48 horas con ayuda del equipo IncuCyte ZOOM, tomando fotos de las células cada 4 horas, en donde se determina el porcentaje de confluencia vs tiempo. Posteriormente con los datos

obtenidos, se construyó una curva de % de confluencia contra el tiempo. El sistema IncuCyte ZOOM proporciona información sobre los procesos biológicos activos en tiempo real, permitiendo la cuantificación del comportamiento celular a lo largo del tiempo mediante la recopilación y análisis automático de imágenes durante un tiempo determinado.

7.13 *Ensayo de muerte celular en el equipo IncuCyte ZOOM*

En la placa donde se evaluó proliferación celular, transcurridas las 48 horas, se añadió yoduro de propidio (SIGMA, P4170, 10 μ M) para evaluar la muerte celular. Con ayuda del equipo IncuCyte ZOOM, se determina la cantidad de puntos rojos (porcentaje de confluencia de fluorescencia roja) frente al porcentaje de confluencia del pozo.

7.14 *Evaluación del procesamiento de LC3 mediante Western blot*

Para determinar el efecto en el procesamiento de LC3 en las líneas celulares de cáncer de mama, en la misma membrana donde se evaluó la eficacia del silenciamiento de las proteínas ATG7 o Beclin 1, se cortó la membrana de PVDF en la parte donde se encontraban las proteínas de entre 10-26 kDa. Se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de anti-LC3 (Novus Biologicals, NB100-2220, 1:1000); se realizaron 3 lavados con TBS-Tween de 10 minutos cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo para LC3 (Cell signaling, 7074, 1:20 000) a temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween cada uno de 10 minutos y se reveló la membrana con Immobilon™ Western (MILLIPORE, WBKLS0500), el cual se preparó 1:1 de cada de las soluciones (luminol y peróxido) en un tubo y se mezcló por inversión. Se añadieron de 300-500 μ L para cada una de las membranas del lado en donde se encuentran las proteínas, dejándolo

incubar durante 5 minutos, se añadieron 500 μ L de la mezcla anterior en la placa del transiluminador y se colocó la membrana en el transiluminador Li-Cor para escanearla y observar el resultado. En relación al control de carga, se utilizó la proteína β -actina usada como control de carga para la evaluación del silenciamiento de las proteínas ATG7 o Beclin 1.

8. Resultados

El plásmido pLKO.1 es un vector de expresión lentiviral en mamíferos que se utiliza para la expresión de shRNAs con un tamaño de 7052 pb (ver Anexo 2). Al introducir la secuencia del shRNA, la construcción no varía en más de 20 pb adicionales.

En un inicio, se pensaba trabajar con dos shRNAs, uno dirigido hacia la proteína Atg7 y otro hacia Beclin 1, ambas en ratón. Por problemas técnicos se optó por trabajar con un shRNA para humano (hATG7) y otro para ratón (mBecn1), como se muestra en la tabla 3. El plásmido pLKO.1 con la secuencia hATG7, fue caracterizado previamente en el laboratorio (Castilla, 2016). Sin embargo, para el plásmido pLKO.1 con la secuencia mBecn1, se tuvo que realizar una transformación bacteriana y posteriormente una extracción de DNA plasmídico por la técnica de mini-prep, con la finalidad de verificar que las bacterias que habían sido transformadas, efectivamente contenían el plásmido de interés.

Tabla 3. Concentración y pureza del DNA plasmídico obtenido del protocolo de mini-prep.

ID clonal	Gen	Secuencia shRNA	Concentración (ng/ μ L)	Pureza (260/280)
TRCN000007857	hATG7	CCCAGCTATTGGAACACTGTA	522	1.916
TRCN000087288	mBecn1	CCACATGTTTACAATACCAAA	2170	1.871

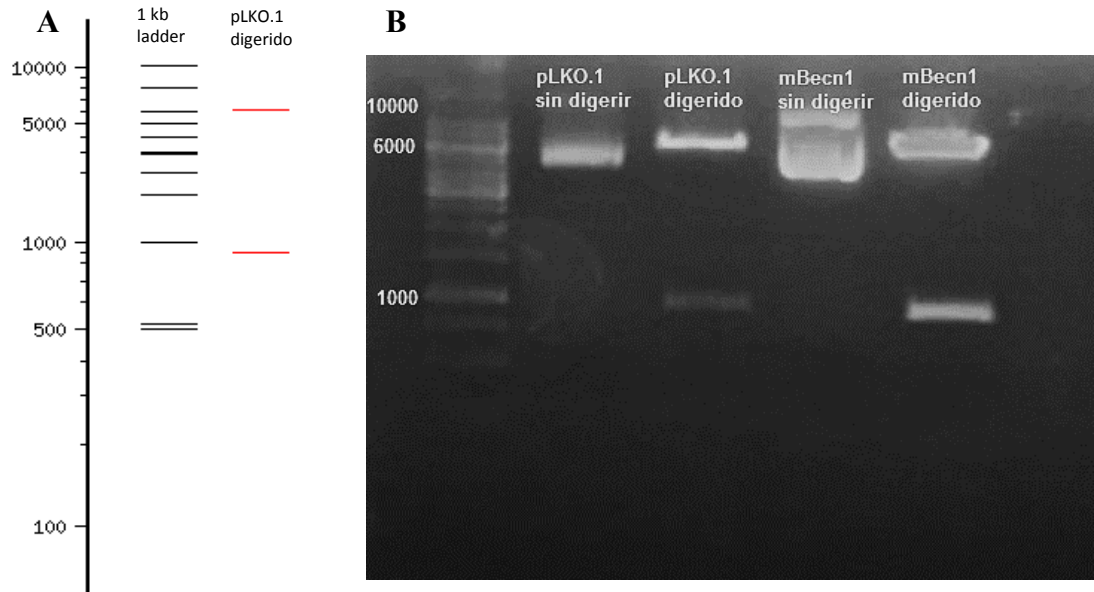


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pLKO.1 obtenido del protocolo de mini-prep. A. Simulación virtual del patrón de bandas del corrimiento electroforético del plásmido pLKO.1 no silenciante en gel de agarosa al 1%, realizando una digestión con la enzima NotI. **B.** Patrón de bandas del corrimiento electroforético del plásmido pLKO.1 no silenciante y Becn1 (Beclin 1) TRCN00008728880, V/50 min, TAE 1x. Ambos vectores fueron digeridos con la enzima NotI, dando como resultado dos fragmentos; uno de 6153 pb y otro de 899 pb.

Con el objetivo de comprobar lo mencionado anteriormente, se realizó una digestión enzimática con NotI y posteriormente una electroforesis en agarosa. Tal y como se muestra en la electroforesis virtual (Fig. 6A), se obtuvieron dos fragmentos tras la digestión: uno de 6153 pb y el otro de 899 pb. Para verificar que el DNA plasmídico extraído corresponde al plásmido de interés, se utilizó como control al vector pLKO.1 no silenciante, es decir, contiene un fragmento diferente a la del shRNA disponible para insertar esta secuencia. Sabiendo que al realizar la digestión enzimática se obtendrán dos fragmentos, al comparar el patrón de bandas de la electroforesis virtual con el del control, corresponde a los mismos fragmentos. De esta manera, al comparar

el control con el plásmido que contiene la secuencia de mBecn1, se observa el mismo patrón de bandas. Con lo cual se puede determinar, que el plásmido extraído, es el plásmido de interés.

Como se muestra en la figura 6, se observa el mismo patrón de bandas en la electroforesis virtual y en el resultado experimental (Fig. 6B), tanto en el control (pLKO.1 no silenciante) como en el plásmido con la secuencia del shRNA (mBecn1). Con ello se determina que el plásmido extraído, es el plásmido de interés.

Posteriormente, se realizó una extracción de DNA plasmídico por la técnica de maxi-prep y se llevó a cabo su purificación, obteniendo así los siguientes resultados:

Tabla 4. Concentración y pureza del DNA plasmídico purificado obtenido del protocolo de Maxi-prep.

ID clonal	DNA plasmídico	Concentración (ng/ μ L)	Pureza (260/280)
87288	mBecn1	311	1.489

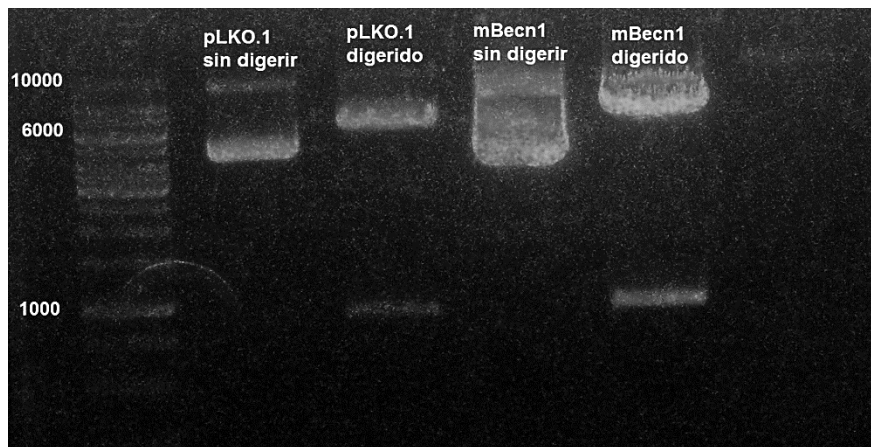


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pLKO.1, 80V/50 min, TAE 1x obtenido del protocolo de Maxi-prep. Se utilizó como control el plásmido pLKO.1 no silenciante, sin digerir y digerido con la enzima NotI. Tanto en el patrón de bandas del plásmido pLKO.1 no silenciante como el Becn1 (Beclin 1) TRCN000087288, se muestra el mismo número de fragmentos de igual tamaño tras la digestión enzimática.

Como se muestra en la figura 7, el plásmido obtenido por Maxi-prep corresponde al plásmido de interés, ya que al comparar entre el control sin digerir y digerido con el plásmido de interés, los fragmentos corresponden al tamaño esperado.

Posteriormente, se llevó a cabo el silenciamiento de dos proteínas importantes en el proceso autofágico, Beclin 1 y ATG7, en líneas celulares de ratón y humano, respectivamente, a través de un shRNA. Estas proteínas actúan en etapas de nucleación y de expansión de la autofagia, por lo que al silenciarlas, se vería inhibido este proceso.

Para comprobar que efectivamente el silenciamiento de estas proteínas se llevó a cabo, se realizó un Western blot, observando que en las células transducidas con los lentivirus que contenían la secuencia del shRNA de Beclin 1, disminuyó la proteína en comparación con el no silenciante, control de este experimento, tal y como se muestra en las figuras 8 y 9, tanto en las líneas celulares de humano como de ratón.

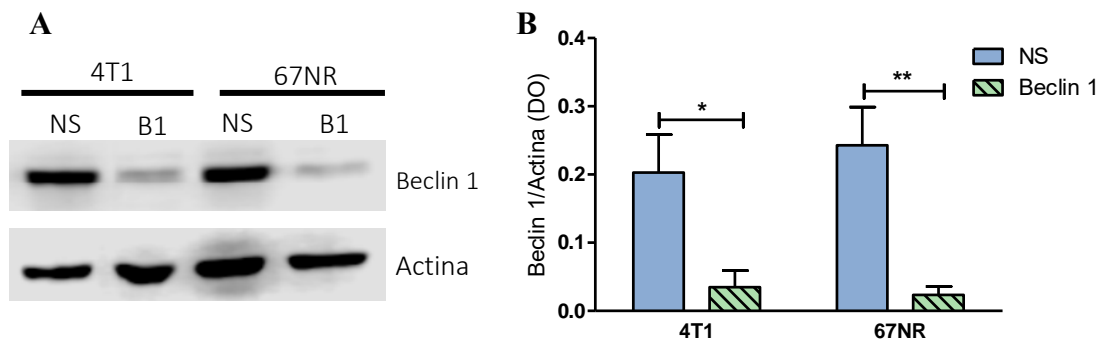


Figura 8. Silenciamiento de la proteína Beclin 1 en líneas celulares de cáncer de mama de ratón.

A. Los lisados celulares de las líneas 4T1 y 67NR fueron analizadas por medio de Western Blot para evaluar el silenciamiento de Beclin 1 (NS, no silenciante; B1, shRNA de Beclin 1). **B.** Niveles de la proteína Beclin 1 tras el análisis de la densidad óptica; se observa la disminución de los niveles de esta proteína con el uso del shRNA de Beclin 1 en comparación con el no silenciante. Los datos fueron analizados con una t de student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, $n = 3$.

En relación al silenciamiento de las líneas celulares de origen humano (Fig. 9), en la línea MCF7 se observa un silenciamiento casi en su totalidad. Sin embargo, en la línea celular MDA-MDB-231, no se observó el mismo resultado, ya que se muestra únicamente una disminución en la intensidad de la banda relacionada a la proteína ATG7.

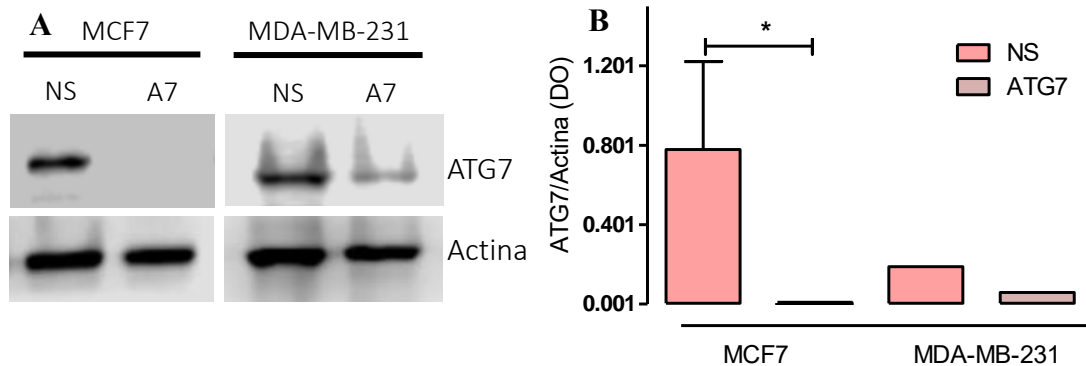


Figura 9. Silenciamiento de la proteína ATG7 en líneas celulares de cáncer de mama de origen humano. **A.** Los lisados celulares de esta línea fueron analizados por medio de Western blot para evaluar el silenciamiento de ATG7 (NS, no silenciante; A7, shRNA de ATG7). **B.** Niveles de la proteína ATG7 tras el análisis de la densidad óptica; se muestra la disminución de los niveles de esta proteína con el uso del shRNA en comparación con el no silenciante. Los datos fueron analizados con una t de student, * $p < 0.05$. Para la línea celular MCF7 se obtuvo una $n=3$; para la línea celular MDA-MD-231 se obtuvo una $n=1$.

Una vez comprobado el silenciamiento de ambas proteínas, se evaluó el procesamiento de LC3 en las líneas celulares de cáncer de mama al inhibir la autofagia. Para la evaluación de este ensayo se cuantificó la proteína LC3-II, proteína presente en la membrana de los autofagosomas, por medio de su cuantificación se tiene una idea de la cantidad de autofagosomas que se están formando o en otros casos, de que LC3 se procesa para la formación de estas estructuras. De acuerdo con los resultados obtenidos, en las líneas celulares de ratón tras la inhibición de la autofagia al silenciar Beclin 1,

LC3-II tiende a aumentar (Figs. 10A y 10B). Por lo contrario, en las líneas celulares de cáncer de mama de humano al inhibir ATG7, LC3-II se ve disminuido (Figs. 10D y 10F).

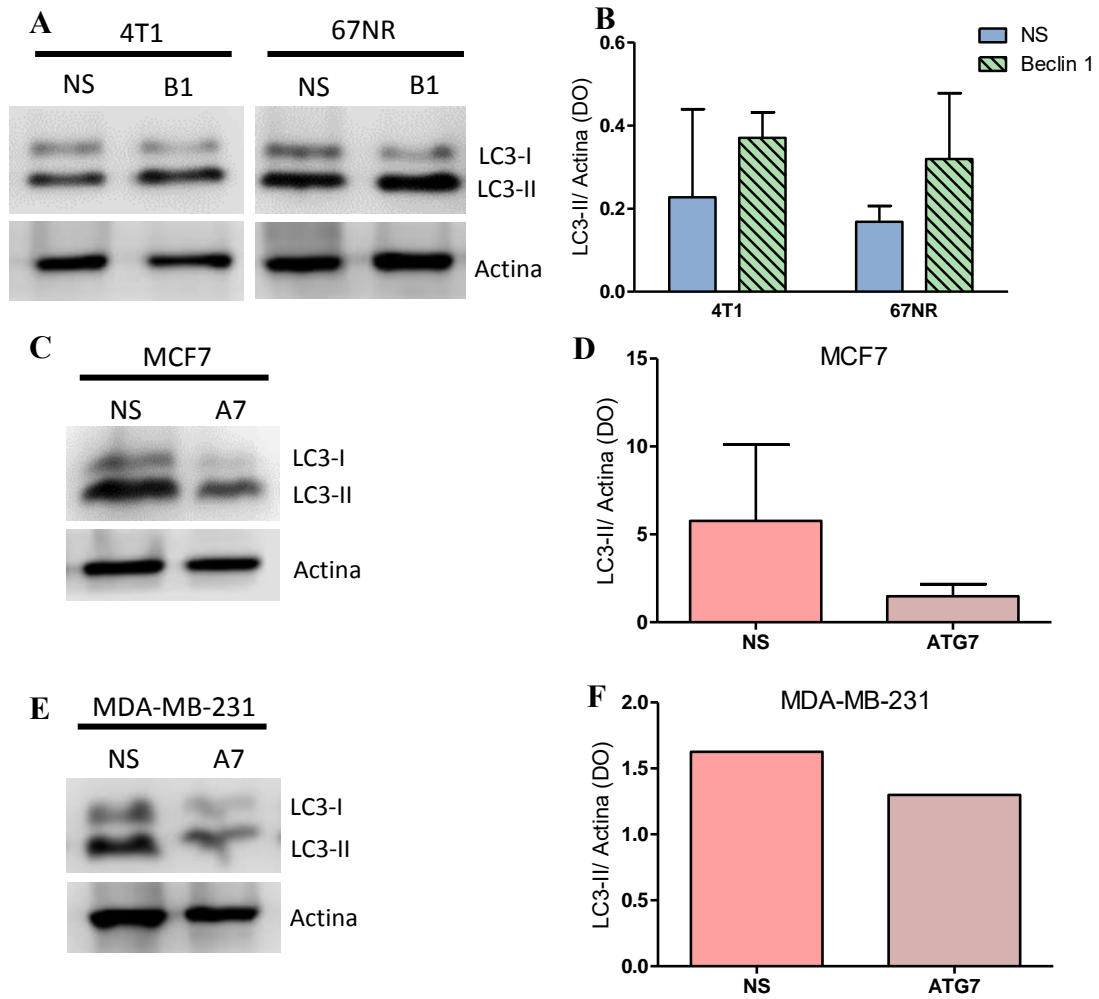


Figura 10. El procesamiento de LC3 varía dependiendo de la proteína silenciada de la autofagia.

A, C y E. El procesamiento de LC3 fue evaluado por medio de Western blot, analizando los niveles de LC3-II tras el silenciamiento de la autofagia (NS, no silenciante; B1, shRNA de Beclin 1, A7, shRNA de ATG7). **B, D y F.** Niveles de LC3-II determinados por tras el análisis de la densidad óptica. Los datos fueron analizados con una t de student. Se realizó una n=3 para la línea celular MCF7, mientras que para la línea celular MDA-MB-231 sólo se obtuvo una réplica.

Posteriormente, se evaluó el efecto que tenía la inhibición genética de la autofagia en relación a la proliferación y la muerte celular. En cuanto a la evaluación de la proliferación, en las líneas celulares de origen murino (4T1 y 67NR) como se muestra en la figura 11, no se observaron cambios en este parámetro tras la inhibición de la autofagia en comparación con el control (no silenciante). Sin embargo, tienen diferentes comportamientos ambas líneas, observando que la línea celular 4T1 prolifera en mayor medida en comparación con la línea 67NR, en un periodo de 48 horas.

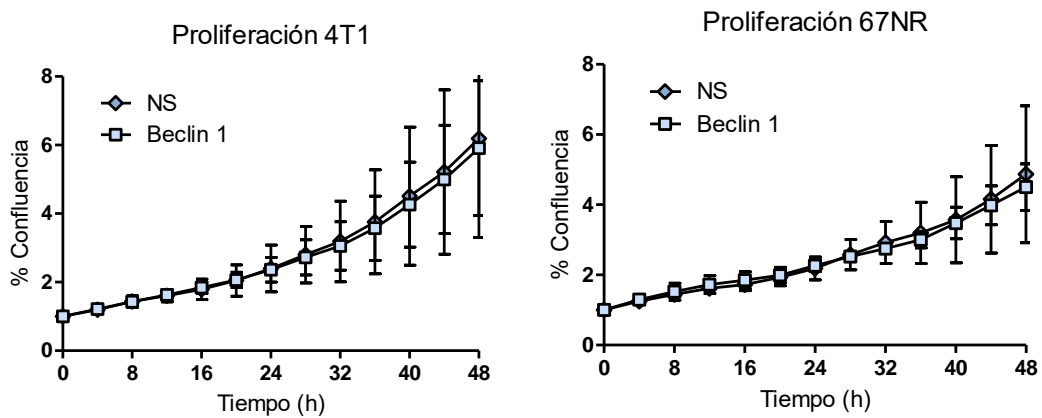


Figura 11. La inhibición genética de la autofagia no modifica la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo de ratón. Proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama de ratón tras la inhibición de la autofagia durante 48 horas (NS, no silenciante; Beclin 1, shRNA de Beclin 1). Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías, $n=3$, donde cada n consta de 3 réplicas.

En relación a las líneas celulares de humano, en la línea celular MCF7 que se caracteriza por ser RE+, no se mostraron cambios en la proliferación en comparación con el control al inhibir genéticamente la autofagia. Sin embargo, en la línea celular MDA-MB-231 que es de tipo triple negativo, al inhibir de forma genética la autofagia, se observó una disminución en la proliferación con respecto al control como lo muestra la figura 12, lo cual lleva a pensar que las líneas celulares de cáncer de mama tienen diferente sensibilidad a la inhibición genética de la autofagia.

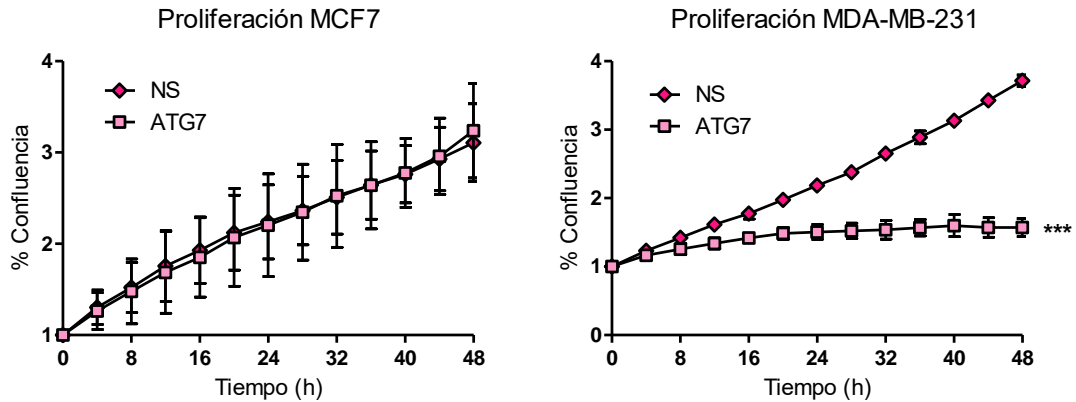


Figura 12. La inhibición genética de la autofagia disminuye la proliferación de las líneas celulares triple negativo de origen humano. Proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama de humano tras la inhibición genética de la autofagia durante 48 horas (NS, no silenciante; ATG7, shRNA de ATG7). Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías, *** $p < 0.0001$, $n=3$ para la línea MCF7, $n=2$ para la línea celular MDA-MB-231, donde cada n consta de 3 réplicas.

Posteriormente se analizó el efecto que tiene la inhibición genética de la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama en relación a la muerte celular. Tanto en la línea celular 4T1 como la 67NR, no hay cambios en la muerte celular al inhibir genéticamente la autofagia, lo cual puede observarse en la figura 13. Como se observa en la figura 13A, el número de núcleos rojos es menor en la condición no silenciante, mientras que al silenciar Beclin 1 en estas líneas celulares, aumenta el número de núcleos rojos, lo que nos indica que hay mayor número de células muertas.

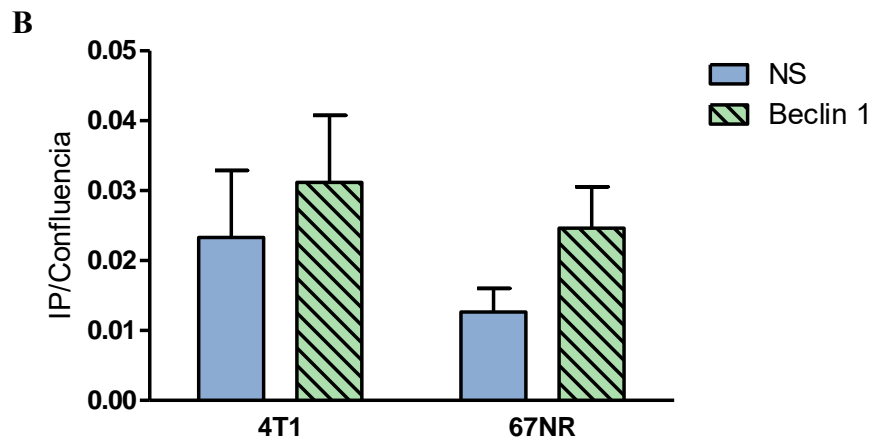
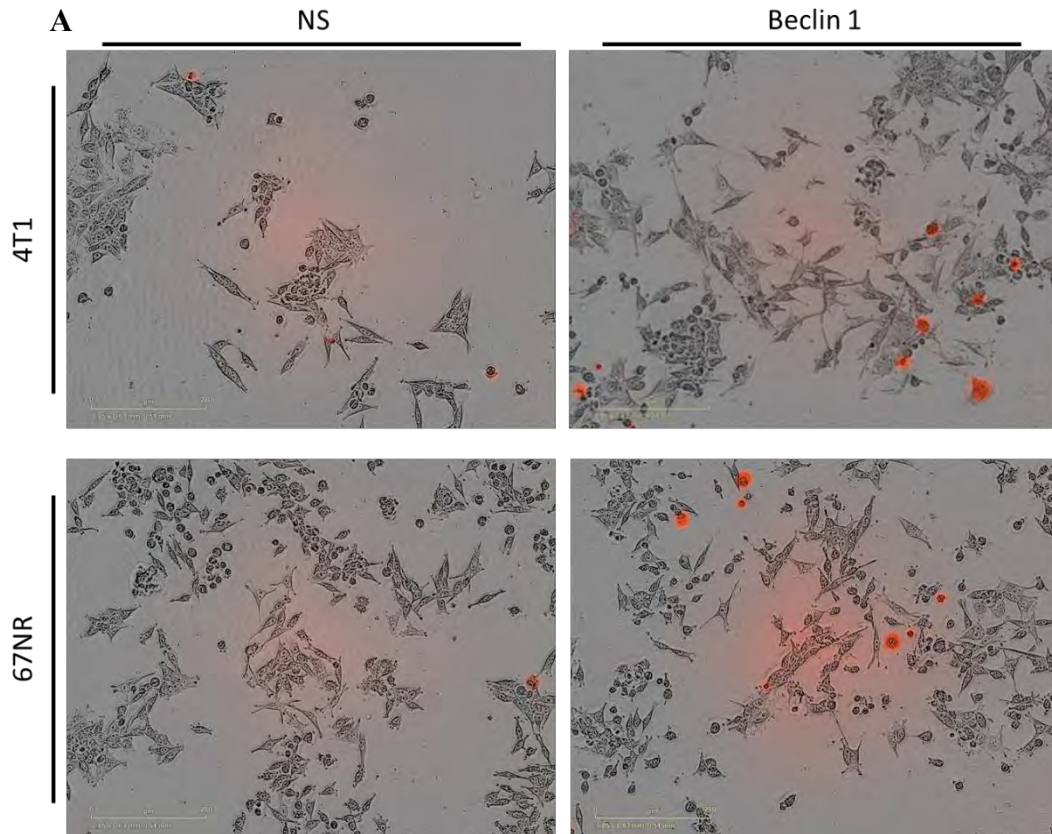


Figura 13. La inhibición genética de la autofagia no altera la muerte celular en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo de ratón. A. Imágenes de las líneas celulares tomadas 48 horas después de sembrar, a las que se les añadió yoduro de propidio; los núcleos rojos muestran las células positivas a este colorante debido a la pérdida de la permeabilidad de la membrana, 40x. **B.** Análisis de la relación de células positivas a yoduro de propidio contra la confluencia del plato, en ambas líneas celulares no hay diferencias entre las células no silenciadas y a aquellas que se les inhibió la autofagia

por el silenciamiento de Beclin 1. Los datos fueron analizados con una t de student, n=3, donde cada n consta de 3 réplicas.

Por otro lado, en las líneas celulares de origen humano, en la línea celular MCF7 la inhibición de la autofagia no indujo ningún cambio en la muerte de estas células. En cambio, en la línea celular de tipo triple negativo MDA-MB-231, se observó un aumento en la muerte celular cuando se inhibe genéticamente la autofagia, lo que podría sugerir que este tipo de células son más sensibles a la inhibición de este proceso.

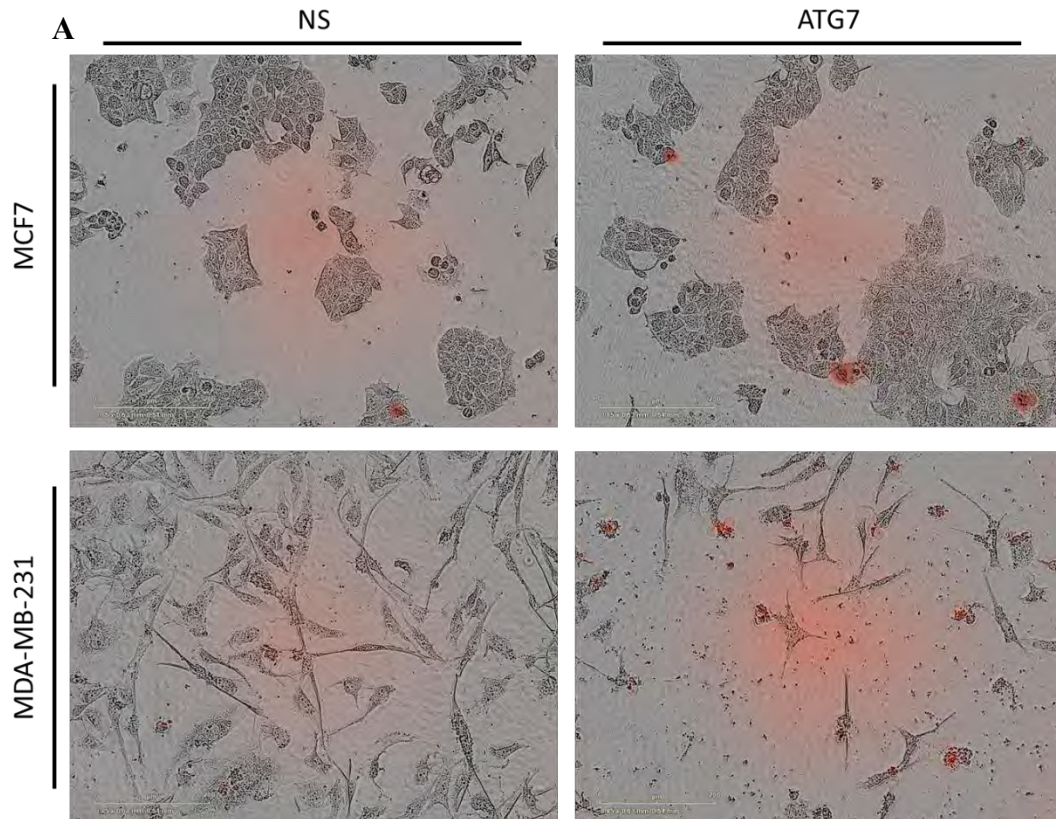


Figura 14. La inhibición de la autofagia induce la muerte de las células triple negativo humanas..

Imágenes de las líneas celulares tomadas 48 horas después de sembrar, a las que se les añadió yoduro de propidio; los núcleos rojos muestran las células positivas a este colorante debido a la pérdida de la permeabilidad de la membrana, 40x.

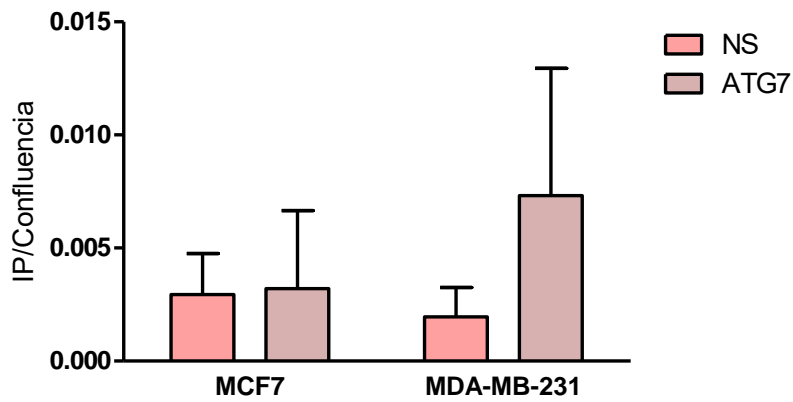


Figura 15. La inhibición de la autofagia aumenta la muerte de las células triple negativo humanas.

Análisis de la relación de células positivas a yoduro de propidio contra la confluencia del plato. La línea celular de cáncer de mama de tipo luminal no fue sensible a la inhibición, mientras que la línea celular del subtipo triple negativo, tiende a aumentar su muerte celular al inhibir la autofagia. Los datos fueron analizados con una t de student. n=3 para la línea celular MCF7, n=2 para la línea celular MDA-MB-231, donde cada n consta de 3 réplicas.

9. Discusión

En este trabajo se llevó a cabo la inhibición de la autofagia de forma genética, con el uso de shRNAs dirigido a genes involucrados en este proceso, tales como *beclin-1* y *Atg7*. Los productos proteicos de estos genes intervienen en etapas importantes en la autofagia; Beclin 1 es de las principales proteínas del complejo PI3K clase III, que participa en la nucleación, es decir, en etapas tempranas de la autofagia, mientras que la proteína ATG7 interviene en la etapa de elongación del autofagosoma, fase tardía de la autofagia (Bhat et al., 2018; Dikic & Elazar, 2018; Klionsky & Schulman, 2014). El silenciamiento genético de estas proteínas (Fig. 8 y 9) mediante el uso de shRNA se basa en la degradación específica de una secuencia de RNA blanco a través de la inserción citoplasmática de RNA bicatenario idéntico a la secuencia diana. Esta degradación se lleva a cabo por medio de una ruta enzimática que implica diversas proteínas, tales como RISC, Argonata, así como proteínas de unión a RNA de doble cadena, entre otras (Moore et al., 2010).

El silenciamiento por medio de shRNA es una inhibición parcial del gen de interés, a diferencia de cuando se elimina un gen totalmente del genoma. Dicho esto, al observar los niveles de proteína de Beclin 1 (Fig. 8), éstos disminuyen en gran medida en comparación con su control. En relación a los niveles de la proteína ATG7 (Fig. 9), en la línea MCF7 se pudo disminuir en mayor medida los niveles de esta proteína tras su silenciamiento. En la línea MDA-MB-231 se observó una disminución de esta proteína, aunque en menor medida en comparación con la MCF7. Esta disminución no indica que el silenciamiento no haya sido efectivo, pues se sabe que esta línea celular es dependiente de autofagia, lo cual indica que tienen una mayor sensibilidad a la

inhibición de la autofagia y por lo tanto mueren al inhibir este proceso, razón por la que se utilizó como control para este trabajo. Teniendo en cuenta lo mencionado, es probable que las células que se silenciaron eficazmente hayan muerto y no se vean representadas en el Western Blot o que se necesite más tiempo para lograr un silenciamiento equivalente. Sin embargo, aunque el silenciamiento no fue 100% efectivo, se alcanzó un silenciamiento cercano al 68.4% (Fig. 9) que se ve reflejado en una disminución de LC3II (Fig. 10).

En diversos estudios se ha sugerido a la autofagia como un blanco terapéutico para el cáncer, así como adyuvante a la quimioterapia, para una mejor respuesta al tratamiento. La autofagia puede fungir como un mecanismo de homeostasis celular al degradar componentes celulares para su posterior reciclado, que en otras palabras se conoce como “autofagia basal”. En este proceso, una de las etapas que se utiliza para medir autofagia es la elongación del autofagosoma, en donde participa la proteína LC3. Como se sabe, LC3 se procesa con ayuda de dos sistemas de conjugación (ATG5-ATG12 y LC3-PE), a LC3I (forma libre difusa en citoplasma) y posteriormente, se conjuga con PE para dar origen a LC3II, la cual se localiza en las membranas de aislamiento y en los autofagosomas. Es por ello que LC3 es actualmente como el marcador de autofagosomas más utilizado, ya que la cantidad de LC3II refleja el número de autofagosomas en la célula en un momento determinado (Yoshii & Mizushima, 2017).

Se evaluó el procesamiento de LC3 en las diferentes líneas celulares con la finalidad de conocer el efecto que se tenía el silenciar proteínas relacionadas a autofagia, observando niveles distintos de LC3II en cada una de ellas. En las líneas celulares de ratón (Fig 10A y 10B), se inhibió la autofagia al silenciar Beclin 1. Como se mencionó,

esta proteína forma parte del complejo PI3K de clase tipo III y participa en la fase de nucleación, es decir, ayuda al reclutamiento y localización de proteínas de unión a PI3P en las membranas pre-autofagosomales, para dar lugar a la expansión de la membrana (Pattingre et al., 2005).

El complejo PI3K es necesario para el inicio de la autofagia; la inhibición de estos factores da como resultado la ausencia de formación de membranas de aislamiento, lo cual se vería reflejado en una disminución en el flujo autofágico (Yoshii & Mizushima, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos son contrarios a esta idea. Al inhibir la autofagia silenciando Beclin 1 en estas líneas celulares, el procesamiento de LC3 aumentó. Esto se podría explicar debido a que el procesamiento de LC3 puede continuar a pesar de la ausencia de Beclin 1, es decir, Beclin 1 ayuda al reclutamiento de proteínas a un sitio específico de la célula, con la finalidad de ensamblar toda la maquinaria relacionada a la autofagia y dar lugar a las estructuras de aislamiento de este proceso en una ubicación subcelular particular. Si no está presente Beclin 1 en la vía autofágica, el procesamiento de LC3 seguirá a pesar de no haya un sitio específico de ensamblaje (Dikic & Elazar, 2018; Pattingre et al., 2005). Al respecto, ya se ha reportado que el silenciamiento de Beclin 1 no afecta los niveles basales de LC3II ni su aumento en respuesta a la privación de nutrientes, pero si evita el procesamiento de p62 y disminuye la formación de puntos positivos a GFP-LC3 en respuesta a la privación de nutrientes (He et al., 2013).

Otra explicación que se tiene para este comportamiento, pero de la cual no existen muchas evidencias, es debido a una variante de autofagia denominado “autofagia no canónica”, en donde se ha reportado que la autofagia no requiere de todo el conjunto

de las proteínas ATG, en particular de Beclin 1 y VPS34, para efectuarse. Por lo que puede llevarse a cabo de una manera independiente de Beclin 1, a pesar de que esta proteína desempeña un papel importante en la autofagia. En este tipo de autofagia se encuentran los diferentes tipos de autofagia selectiva: mitofagia, lipofagia, xenofagia, entre otros. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se da la formación de autofagosomas por esta vía. (Zhang, Du, Meng, Zong, & Wang, 2013).

En relación a las líneas celulares de cáncer de mama humanas al silenciar ATG7, se espera que disminuya el flujo autofágico, ya que ésta es una proteína importante en la etapa de elongación de la membrana del autofagosoma, pues participa en la activación de LC3, es decir, ayuda a la formación de LC3II, activando a LC3I. Asimismo, interviene en la conjugación de ATG12 a ATG5, para promover la expansión de la membrana. Si disminuye ATG7, por ende, disminuirá el procesamiento de LC3 y con ello, disminuirá la formación de autofagosomas, lo cual se pudo comprobar al obtener una disminución de LC3-II al inhibir la autofagia genéticamente, como se observa en la figura 8 (Dikic & Elazar, 2018).

De igual manera, se observó que las diferentes líneas celulares presentan niveles distintos de autofagia (Fig. 10). En relación a las líneas celulares de origen murino, éstas son del subtipo triple negativo, pero se ha visto que tienen diferente capacidad metastásica. A pesar de que ambas líneas celulares proceden del mismo tumor, la línea celular 67NR se caracteriza por ser altamente tumorigénica pero no es metastásica, mientras que la línea celular 4T1 es una línea altamente metastásica, llegando a diversos órganos como pulmón, cerebro, hueso, entre otros (Maycotte et al., 2012). Se ha reportado en diversos estudios la posible correlación que tendría el marcador de

autofagia (LC3) con el resultado del paciente en cáncer de mama, en donde los cánceres de mama con mayores niveles de LC3-II, se encontraron marcadores aumentados de proliferación celular, agresividad y peor resultados. Sin embargo, el aumento de LC3-II no necesariamente indica un aumento en los niveles de autofagia, ya que el bloqueo del flujo autofágico mostraría de igual manera este incremento (Maycotte et al., 2014).

Por otra parte, se encontró que los diferentes subtipos de cáncer de mama muestran una distinta dependencia de la autofagia, determinando que la línea celular de cáncer de mama triple negativo (CMTN) humana es sensible a la inhibición de la autofagia en comparación con la línea celular RE+ (Figs. 12 y 15). Estas células triple negativo eran dependientes de la autofagia aún en cultivos con medio suplementado, es decir, sin inducir autofagia por condiciones de estrés como la falta de nutrientes. La línea celular de tipo RE+, no mostró cambios en su proliferación ni muerte celular, por lo que se considera que ese subtipo de cáncer de mama es independiente a la inhibición de la autofagia.

Se sabe que una de las características distintivas de las células CMTN es que presentan altos niveles de activación de la vía de JAK-STAT. Las proteínas STAT se asocian a procesos de diferenciación y crecimiento celular. No obstante, su activación constitutiva se ha relacionado con tumorigénesis, al inducir la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, prevención de apoptosis, inflamación en cáncer, entre otros procesos. En el trabajo de Maycotte y colaboradores (2014), se determinó que las líneas celulares de cáncer de mama que tenían altos niveles constitutivos de la actividad de STAT3 (que corresponden a líneas celulares pertenecientes al subgrupo CMTN) eran más sensibles a la inhibición de la autofagia

que aquellas líneas celulares con niveles bajos de la actividad de STAT3 (como lo son las líneas celulares RE+), aún en condiciones sin estrés metabólico añadido. Es así, que este comportamiento se debe a la activación de STAT3 dependiente de autofagia (Maycotte et al., 2014). Al ser MDA-MB-231 una línea celular de CMTN, posee altos niveles de STAT3, por lo que al inhibir genéticamente la autofagia, es más sensible a la inhibición de este proceso, contrario a la línea celular MCF7 (RE+), que posee bajos niveles de STAT3.

En líneas celulares de tipo triple negativo de origen murino (Figs. 11 y 13), no se observó el mismo comportamiento que el de la línea MDA-MB-231 a pesar de pertenecer al mismo subtipo de cáncer de mama triple negativo, pues al inhibir la autofagia su proliferación y muerte celular eran muy similar en comparación al no silenciante. Con ello podría decirse que estas líneas celulares no son sensibles a la inhibición de la autofagia. De acuerdo a diversas evidencias, se sabe que estas líneas celulares al ser del subtipo CMTN, presentan niveles altos de STAT3 constitutivamente activos. Curiosamente al inhibir la vía JAK/STAT3 de diferentes formas (a través de un shRNA contra STAT3 e inhibir farmacológicamente a JAK, evitando la fosforilación de STAT3), no hubo cambios en la proliferación *in vitro* de estas líneas celulares. Sin embargo, se tiene un efecto contrario en modelo *in vivo*, pues la inhibición de STAT3 disminuye el crecimiento tumoral y la metástasis, lo cual se puede relacionar al papel que tiene el microambiente tumoral, efecto que no se puede observar en modelos *in vitro*. La importancia de la señalización de JAK en el microambiente tumoral está respaldada por hallazgos que demuestran los efectos supresores del crecimiento así como de la progresión tumoral, a la inhibición de JAK en un tumor

Stat3 $-/-$, rodeado de células estromales Stat3 $+/+$ (Chang et al., 2013; Ling & Arlinghaus, 2005). A pesar de que no se observó el mismo efecto en las líneas celulares de CMTN de origen murino que en la de origen humano, esto podría indicar que la activación de STAT3 es independiente de la autofagia.

A pesar de no modificar la proliferación y muerte celular de todas las líneas celulares de cáncer de mama al inhibir genéticamente la autofagia, se determina que se pudo estandarizar la técnica por todos los resultados anteriores que muestran el silenciamiento de las proteínas ATG de interés. Además, al inhibir genéticamente la autofagia en la línea MDA-MB-231, control de nuestros experimentos, se pudo observar el mismo efecto que el reportado en la literatura, es decir, la dependencia a la autofagia de esta línea celular.

El resultado de inhibir la autofagia de manera farmacológica y genéticamente es diferente. De acuerdo con los antecedentes de este trabajo, la inhibición farmacológica de la autofagia utilizando CQ promueve la muerte celular y disminuye la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de mama, datos distintos en comparación con el silenciamiento de proteínas que intervienen en este proceso. Esta diferencia puede estar relacionada con el efecto tóxico que ejerce la CQ sobre las células de cáncer de mama, pues se sabe que la CQ evita la fusión del autofagosoma con el lisosoma y por lo tanto, promueve la acumulación de autofagosomas, ejerciendo un efecto citotóxico sobre las células por la acumulación excesiva de estas estructuras. Cuando la actividad lisosómica es limitada, la síntesis excesiva de autofagosomas ocasiona el agotamiento de energía y de nutrientes, ejerciendo así toxicidad celular. Probablemente en periodos prolongados, el estrés inducido con la falta de energía cause un ciclo de

retroalimentación que induzca aún más la formación de autofagosomas, lo cual agravará la situación y posiblemente promueva la muerte celular. Aunado a lo anterior, la pérdida de viabilidad podría estar relacionada con los defectos de la autofagia en cuanto a la eliminación de sustratos tóxicos o presencia de organelos dañados; un ejemplo claro de esto es la presencia y aumento de EROS, producida por la acumulación de mitocondrias dañadas y la falta de su eliminación, evidencia que sugiere que las EROS contribuyen a la toxicidad en las células (Button, et. al., 2017). Además de lo mencionado, la autofagia es una vía de secreción de diferentes proteínas que pueden ayudar al cáncer. De acuerdo con esto, se sabe que la señalización autócrina o paracrina en células cancerosas sostiene la proliferación excesiva, reducción de la apoptosis, regulación de las células inmunitarias, así como a la angiogénesis o el desarrollo de resistencia a terapias contra el cáncer) (Cotzomi, et. al., 2018). En este sentido, la secreción mediada por autofagia podría producir un efecto diferente al inhibir este proceso de manera farmacológica y genéticamente. Al inhibir la autofagia farmacológicamente, se bloquea la degradación del contenido de los autofagosomas, pero es posible su formación, los cuales a su vez, podrían estar secretando proteínas que promuevan su proliferación y evadan la apoptosis. Sin embargo, al inhibir la autofagia de manera genética, no es posible la formación de autofagosomas que puedan secretar proteínas, las cuales puedan promover diversos procesos característicos del cáncer.

Con los resultados obtenidos no es posible comparar entre que proteína ATG es mejor para inhibir la autofagia, ya que se silenciaron distintas proteínas en diferentes modelos. A pesar de que tanto Beclin 1 como ATG7 tienen sus ventajas y desventajas al

momento de silenciarlas, se recomienda el silenciamiento de ambas proteínas en el mismo modelo, ya sea utilizando la línea celular de ratón o la línea celular de humano y de esta manera, es posible equiparar los resultados obtenidos.

10. Conclusiones

- Se estandarizó una técnica para inhibir la autofagia genéticamente por medio de un sistema lentiviral de shRNAs contra proteínas ATG.
- Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron distinta sensibilidad a la inhibición genética de la autofagia.
- Las líneas celulares de cáncer de mamá de origen murino del subtipo triple negativo no son sensibles a la inhibición genética de la autofagia.
- La línea celular de cáncer de mama del subtipo triple negativo de origen humano es dependiente de autofagia, mientras que la línea celular de cáncer de mama de RE+ no es sensible a la inhibición de la autofagia.
- La inhibición genética de la autofagia por medio del silenciamiento de Beclin 1 aumenta los niveles de LC3II en las líneas celulares de cáncer de mama.
- La inhibición genética de la autofagia por medio del silenciamiento de ATG7 disminuye los niveles de LC3II en las líneas celulares de cáncer de mama.
- La inhibición genética de la autofagia produce diferentes respuestas en la proliferación y muerte de las líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con la inhibición farmacológica de este proceso.
- No fue posible comparar entre el silenciamiento de Beclin 1 y ATG7 para la elección de la mejor proteínas ATG para la inhibición genética de la autofagia.
- Los niveles de LC3 en las líneas celulares de cáncer de mama de origen murino podrían correlacionarse con la capacidad metastásica.

11. Perspectivas

La estandarización de la técnica para inhibir genéticamente a la autofagia por medio de un sistema lentiviral de shRNAs contra proteínas ATG, facilitará el desarrollo de futuros proyectos.

Se recomienda el silenciamiento de las proteínas ATG7 y Beclin 1 en el mismo modelo, con la finalidad de poder comparar entre que proteína de la autofagia se lleva a cabo mejor la inhibición de este proceso.

Asimismo, podría elegirse una proteína ATG diferente a Beclin 1, por ejemplo ATG5, para conocer el efecto que produce el silenciamiento de la misma y pueda realizarse un estudio comparativo más completo en relación a la inhibición de la autofagia.

Finalmente, será importante estudiar el motivo por el cual las líneas celulares de cáncer de mama de origen murino son independientes de autofagia y si eso está relacionado con la dependencia de STAT3.

12. Referencias

- AddGene. (2018). Lentiviral Plasmids. Retrieved November 25, 2018, from <https://www.addgene.org/viral-vectors/lentivirus/?fbclid=IwAR2ZDpLe5IRFOsAaGFrZkqvtvToCmLLaSmCfrNSAaenRD45811AYte82msE>
- American Cancer Society. (2017). Signos y síntomas de cáncer de seno. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/signos-y-sintomas-del-cancer-de-seno.html>
- ATCC. (2016). Cell lines. Retrieved November 21, 2018, from https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx
- Bhat, P., Kriel, J., Shubha Priya, B., Basappa, Shivananju, N. S., & Loos, B. (2018). Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochemical Pharmacology*, *147*, 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.021>
- Button, R. W., Roberts, S. L., Willis, T. L., Oliver Hanemann, C., & Luo, S. (2017). Accumulation of autophagosomes confers cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(33), 13599–13614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782276>
- Cárdenas Sánchez, J., Bargalló Rocha, E., Erazo Valle, A., Poitevin Chacón, A., Valero Castillo, V., & Pérez Sánchez, V. (2015). *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 14).
- Castilla, C. (2016). *Papel de la autofagia en la sobrevivencia de líneas celulares de cáncer de ovario*. (Tesis de pregrado). Benemérita Universidad Autónoma de

Puebla. Puebla, México.

Castrezana Campos, M. del R. (2017). Geografía del cáncer de mama en México.

Investigaciones Geográficas, (93), 1–18. <https://doi.org/10.14350/rig.56879>

CDC. (2018). ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de mama? Retrieved from

https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm

Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S. P., Daly, L., ... Bromberg,

J. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia*, 15(7), 848-IN45. <https://doi.org/10.1593/neo.13706>

Choi, A. M. K., Ryter, S. W., & Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and

Disease. *New England Journal of Medicine*, 368(7), 651–662. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>

Collins, A. &. (2015). A short introduction to breast cancer. Retrieved from

http://www.komennyc.org/site/PageServer?pagename=view_breastcancer&sec=2

Consejo de Salubridad General. (2009). Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de

Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención. *Guía de Práctica Clínica*, 1–57. <https://doi.org/389-10>

Cotzomi-Ortega, I.; Aguilar-Alonso, P.; Reyes-Leyva, J. & Maycotte, P. (2018).

Autophagy-mediated secretion in cancer. *Mediators of Inflammation*.

Cotzomi, I. & Maycotte, P. (2018). *Papel de la secreción de MIF mediada por*

autofagia en la progresión tumoral. (Tesis en proceso). Benemérita Universidad

Autónoma de Puebla. Puebla, México.

Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., ... Kroemer, G. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, 34(7), 856–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>

GLOBOCAN. (2018). Cancer today. Retrieved February 12, 2018, from <http://gco.iarc.fr/today/home>

Godone, R. L. N., Leitão, G. M., Araújo, N. B., Castelletti, C. H. M., Lima-Filho, J. L., & Martins, D. B. G. (2018). Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(June), 14–34. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.066>

Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, J. (2017). Autophagy and Cancer Metabolism. *Methods Enzymol*, 4(11), 1–28. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30265-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30265-0). Cost-effectiveness

He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., ... Levine, B. (2013). Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell*, 154(5), 1085–1099. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.035>

Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Verovskaya, E. V, Figueroa, M. E., & Passequé, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function

of young and old (hematopoietic) stem cells. *Nature*, 543(7644), 205–210.
<https://doi.org/10.1038/nature21388>.Autophagy

INEGI. (2017). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. *Inegi*, 1–14. Retrieved from http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf

Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*, 3(6), 610–613. <https://doi.org/10.4161/auto.4867>

Karsli-uzunbas, G., Guo, J. Y., Price, S., & Teng, X. (2014). Autophagy is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance, (732). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0363>

Klionsky, D. J., & Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(4), 336–345. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2787>

Levy, J. M. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 528–542.

Ling, X., & Arlinghaus, R. B. (2005). Knockdown of STAT3 Expression by RNA Interference Inhibits the Induction of Breast Tumors in Immunocompetent Mice. *Cancer Res*, 65(7), 2532–2536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2425>

Luna, C. O., & Sarmiento, R. G. (2016). Evaluation of Chloroquine Effect in Autophagy of Breast Cancer Cells and its Possible Use in Chemotherapy. *FarmaJournal*, 1(1), 41–51.

- Maciel-Herrerías, M., & Cabrera-Benítez, S. (2016). The role of autophagy in pulmonary diseases. *Neumol Cir Torax*, 75(3), 227–236.
- Manent, J., Banerjee, S., De Matos Simoes, R., Zoranovic, T., Mitsiades, C., Penninger, J. M., ... Richardson, H. E. (2017). Autophagy suppresses Ras-driven epithelial tumourigenesis by limiting the accumulation of reactive oxygen species. *Oncogene*, 36(40), 5576–5592.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961–967.
- Maycotte, P. (2014). Targeting autophagy in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 224. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.224>
- Maycotte, P., Aryal, S., Cummings, C. T., Thorburn, J., Morgan, M. J., & Thorburn, A. (2012). Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*, 8(2), 200–212.
- Maycotte, P., Gearheart, C. M., Barnard, R., Aryal, S., Levy, J. M. M., Fosmire, S. P., ... Thorburn, A. (2014). STAT3-Mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Research*, 74(9), 2579–2590.
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T., & Taxman, D. J. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol.*, 629(2), 141–158. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3>
- National Cancer Institute. (2018). Terapias biológicas para el cáncer. Retrieved September 21, 2018, from

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-terapias-biologicas-respuestas>

Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.169>

Ortiz, B. (2009). RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigacion Clinica*, 61(5), 412–427.

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., ... Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>

Russnes, H. G., Lingjærde, O. C., Børresen-Dale, A. L., & Caldas, C. (2017). Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *American Journal of Pathology*, 187(10), 2152–2162. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.022>

Salgado, J. & Maycotte, P. (2018). *Papel de la autofagia en la liberación del MIF*. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

SIGMA. (2018). Vector maps. Retrieved November 20, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>

- ThermoFisher Scientific. (2018). NotI. Retrieved November 20, 2018, from [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012153_NotI_10_UuL_1500U_UG.pdf&title=User Guide: NotI, 10 U/uL, 1500U](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012153_NotI_10_UuL_1500U_UG.pdf&title=User%20Guide:%20NotI,%2010%20U/uL,%201500U)
- Under, S., George, H. & Boedeker, B. (2018). MISSION™ shRNA Library: Next Generation RNA Interference. Retrieved October 10, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/life-science-innovations/mission-shrna-library0.html>
- Wang, H. (2013). *Autophagy and Cancer*. (H.-G. Wang, Ed.) (Springer). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6561-4>
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), 1–20.
- Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., & Sinicrope, F. A. (2011). The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(9), 1533–1541.
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *Molecular Sciences*, 18(1865), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
- Yustos, M. A., Angulo, M. M., & Soto, M. Á. (2017). Cáncer de mama. *Revista de La Educación Superior*, 12(34), 2011–2023.
- Zarzynska, J. M. (2014). The Importance of Autophagy Regulation in Breast Cancer

Development and Treatment. *BioMed Research International*, 2014, 1–9.

Zhang, H. Y., Du, Z. X., Meng, X., Zong, Z. H., & Wang, H. Q. (2013). Beclin 1 enhances proteasome inhibition-mediated cytotoxicity of thyroid cancer cells in macroautophagy-independent manner. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(2), 217–226. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2679>

ANEXOS

Anexo 1. Soluciones y reactivos

Medio LB

Reactivo	Cantidad	
Triptona	2 g	Esterilizar en autoclave.
NaCl	1 g	
Extracto de levadura	1 g	
H₂O desionizada	200 mL	

Solución I

Reactivo	Volumen	
Glucosa 1M	5 mL	Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.
Tris 1M (pH 8.0)	2.5 mL	
EDTA 0.5 M	2 mL	
H ₂ O desionizada	90.5 mL	

Solución II

Reactivo	Volumen	
NaOH 10 N	400 µL	Preparar en el momento de uso.
SDS 10%	2 mL	
H ₂ O desionizada	17.6 mL	

Solución III

Reactivo	Volumen	
Acetato de potasio 5 M (pH 5.5)	60 mL	Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.
Ácido acético glacial	1.5 mL	
H ₂ O desionizada	28.5 mL	

TE

Reactivo	Volumen	
Tris 1 M (pH 8.0)	10 mL	Ajustar pH a 8.0 y esterilizar en autoclave.
EDTA 0.5 M	2 mL	
H ₂ O desionizada	88 mL	

TAE 10x

Reactivo	Volumen/Cantidad	
Tris base	48.5 g	Aforar a 1 L con H ₂ O desionizada y esterilizar en autoclave.
Ácido acético glacial	11.4 mL	
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 mL	
H ₂ O desionizada	800 mL	

PEG 8000 (13% m/v)

Reactivo	Volumen/Cantidad	
NaCl 1.6 M	1.87 g	Esterilizar por filtración.
PEG 8000	2.6 g	
H ₂ O desionizada	20 mL	

PBS 10x

Reactivo	Volumen/Cantidad	
NaCl	80 g	Esterilizar en autoclave. Aforar a 1 L, el pH debe de ser ≈6.8. Para preparar 1L de PBS 1x, diluir 100 mL de PBS 10x en 900 mL de H ₂ O desionizada.
KCl	2 g	
Na ₂ HPO ₄	11.48 g	
KH ₂ PO ₄	2.4 g	

Buffer RIPA 10x

Reactivo	Concentración
Tris-HCl (pH 7.4)	0.5 M
NP 40	1%
Ácido desoxicólico	2.5%
NaCl	1.5 M
EDTA	10 mM

Bradford 5x

Reactivo	Volumen/Cantidad	
Azul Comassie G-250	50 mg	Aforar a 1 L. Almacenar a 4°C.
Etanol 95%	25 mL	
Ácido fosfórico 85%	50 mL	

Bradford 2x

Reactivo	Volumen
Bradford 5x	2 mL
H ₂ O desionizada	3 mL

Laemmli 2x (buffer de carga)

Reactivo	Concentración
Tris-HCl (pH 6.8)	65.8 mM
Glicerol	26.3%
SDS	2.1%
Azul de bromofenol	0.01%

Acrilamida/Bis acrilamida

Reactivo	Volumen/cantidad	
Acrilamida	87.6 g	Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C en oscuridad máximo 30 días.
N’N’-bis-metileno-acrilamida	2.4 g	
H ₂ O desionizada	300 mL	

Buffer de corrida 10x para electroforesis (pH 8.3)

Reactivo	Volumen/cantidad	
Tris base	30.3 g	Almacenar a 4°C.
Glicina	144 g	
SDS	10 g	
H ₂ O desionizada	1 L	

Buffer de transferencia

Reactivo	Concentración
Tris-HCl (pH 8.3)	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20%

TBS

Reactivo	Concentración	
Tris-HCl	20 mM	Ajustar pH a 7.5
NaCl	500 mM	

Anexo 2. Plásmido pLKO.1

El plásmido pLKO.1 es un vector de expresión en mamíferos, lentiviral o de RNAi, que posee un tamaño de 7052 pb (Fig. 15) y dentro de sus principales características es que posee dos genes de resistencia a antibióticos: ampR, gen de resistencia a la ampicilina para la selección bacteriana y puroR, gen de resistencia a puromicina para la selección de mamíferos. Otra característica importante de este vector es la presencia de un sitio Psi, la cual hace referencia a la señal de empaquetamiento de ARN (SIGMA, 2018).

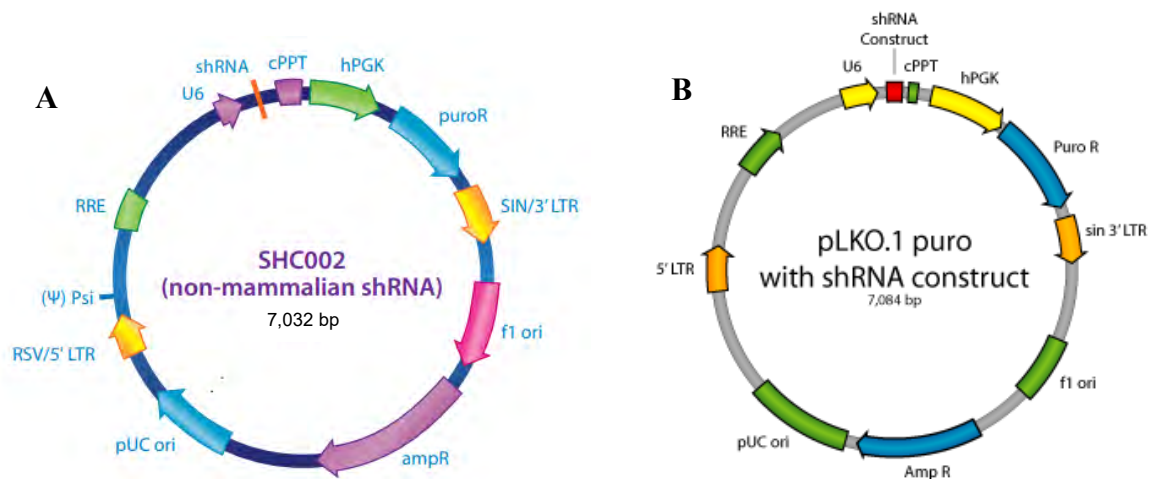


Figura 15. Mapa del vector pLKO.1. A. Mapa del vector pLKO.1 sin la secuencia del shRNA introducida. **B.** Mapa del vector pLKO.1 con secuencia del shRNA introducida (SIGMA, 2018).

Anexo 3. Vectores lentivirales

Los vectores lentivirales son vehículos efectivos para la expresión estable y al largo plazo del shRNA, al ser integrados en el genoma de la célula blanco. Cuando estos vectores son empaquetados dentro de pseudo-partículas virales, es posible introducirlos prácticamente a cualquier tipo de célula mediante infección.

El shRNA es insertado en el vector lentiviral (shRNA-vector lentiviral), el cual contiene los elementos genéticos para la transducción, integración y expresión dentro del DNA genómico de la célula blanco. Las pseudopartículas virales son generadas en células productoras por co-transfección transitoria del shRNA-vector lentiviral, plásmido de empaquetamiento y plásmido de envoltura. El plásmido de empaquetamiento, como su nombre lo indica, contiene la información para la transcripción y empaquetamiento de un RNA copia del shRNA-vector lentiviral dentro de la pseudo-partícula viral. El plásmido de envoltura contiene la información para la síntesis de la envoltura membranal, la cual es esencial para la capacidad de infección. Las pseudo-partículas virales son secretadas al medio de cultivo, recolectadas y posteriormente usadas para infectar a las células blanco. Dentro de la célula blanco ocurre la transcripción inversa de la información contenida en el shRNA-vector lentiviral y la integración al DNA genómico. Posterior a la integración genómica ocurre la expresión del shRNA (y del marcador en su caso), y la capacidad de replicación viral se pierde debido a que genes estructurales están ausentes y los LTR virales están diseñados para auto-desactivación. Los LTRs (“long terminal repeats”) son los promotores virales que contienen toda información para la expresión genética de los retrovirus.

El manejo de vectores virales requiere el uso de medidas de bioseguridad nivel 2, por lo que es necesario verificar los estatus de bioseguridad aplicados al uso de lentivirus en el sitio donde se trabaje.

La eficiencia en la transfección o infección del shRNA también determina que el efecto en el silenciamiento del gen de interés pueda ser detectado, pero a diferencia del uso de siRNAs, los vectores de expresión ofrecen la posibilidad de la introducción de un “marcador” o “reportero” que permita verificar que el shRNA haya sido introducido a la célula de interés. Asimismo, un “marcador” puede ser utilizado para purificar las células transfectadas o infectadas.

Para corroborar que la transducción se lleva de forma adecuada, es necesario el uso de controles. Un control negativo (shRNA control negativo) no presenta una secuencia complementaria a ningún mRNA existente en el organismo de interés. Éste debe ser utilizado para descartar efectos no específicos en la expresión del gen blanco, causado por el procedimiento de introducción shRNA. El control negativo debe ser utilizado en cada experimento realizado y debe usarse para comparar los niveles de silenciamiento del gen blanco.

Anexo 4. Plásmidos empaquetadores

Una característica de seguridad del lentivirus utilizado en la investigación son los componentes necesarios para producir una partícula viral infecciosa (un virión), que generalmente se dividen entre múltiples plásmidos. Algunos plásmidos (típicamente llamados empaquetadores y plásmidos de envoltura) codifican componentes de la cápside y la envoltura virales, y se usan junto con el plásmido que codifica el genoma viral (típicamente llamado plásmido de transferencia). En la siguiente tabla se describen los plásmidos utilizados en este trabajo para la producción de lentivirus (AddGene, 2018).

Tabla 5. Plásmidos empaquetadores utilizados para la producción de lentivirus
(AddGene, 2018)

Plásmido	Características
pVSV-G	Vector que expresa la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Tipo de vector: expresión en mamíferos. Resistencia bacteriana: ampicilina
pRRE	Plásmido de empaquetamiento lentiviral, que expresa genes como Gag y Pol, importantes para la producción de la envoltura. Se puede utilizar como plásmido de transferencia de tercera generación junto con el plásmido que codifica REV (pRSV). Gen de inserción: VIH-1 GAG/POL Tipo de vector: expresión de mamíferos, lentiviral, ensamblaje. Resistencia bacteriana: ampicilina
pRSV	Plásmido de empaquetamiento lentiviral de tercera generación, junto con componentes de ensamblaje. Gen de inserción: Rev Tipo de vector: expresión de mamíferos, lentiviral, ensamblaje. Resistencia bacteriana: ampicilina

Anexo 5. Líneas celulares

Tabla 6. Descripción de las líneas utilizadas en esta investigación (ATCC, 2016; Maycotte et al., 2012)

Línea celular	Origen	Características
MCF7	Humano	Línea celular tumorigénica, proveniente de la glándula mamaria derivada de un sitio metastásico (derrame pleural). Se caracteriza por ser de tipo epitelial (adherente), positiva a RE y RP, negativa a HER2 (luminal A); adecuada para transfección. Expresa genes que codifican proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP). Presenta la capacidad para procesar el estradiol vía receptores de estrógenos. Su crecimiento se inhibe por TNF- α . Esta línea celular se duplica cada 29 hrs. Presenta mutación en BRCA1 WT.
MDA-MB-231	Humano	Línea celular tumorigénica proveniente de la glándula mamaria derivada de un sitio metastásico (derrame pleural). Se caracteriza por ser RE-, RP- y HER2-, es de tipo epitelial, adherente, catalogada como carcinoma ductal invasivo. Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α). Además, expresan el oncogen WNT7B.
67NR	Murino	Línea celular de tumorigénica de subtipo triple negativo, que se caracteriza por ser no metastásica y no tiene la capacidad de abandonar el sitio primario.
4T1	Murino	Línea celular de tumorigénica de subtipo triple negativo, que se caracteriza por ser metastásica a diferentes órganos como hueso, pulmón, cerebro e hígado. Es de tipo epitelial, adherente.

		Los tumores inducidos por 4T1 pueden usarse como un modelo postoperatorio así como un modelo no quirúrgico porque el tumor inducido por 4T1 se metastatiza espontáneamente.
--	--	---

Nota: Tanto la línea celular 67NR como la 4T1 fueron aisladas de un mismo tumor mamario espontáneo procedente de un ratón Balb/cfC3H, por el Dr. Fred Miller en el Instituto de Cáncer Karmanos. (ATCC, 2016).

Anexo 6. Especificaciones de la enzima NotI

La enzima NotI proviene de *Nocardia otitidis*. Esta reconoce la secuencia que se muestra a continuación, dando como resultado extremos cohesivos (Fig. 16).

El buffer recomendado para NotI es el buffer 0 en el cual alcanza una actividad enzimática del 100%; este buffer debe estar a una concentración 1X y está compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 0.1 mg/mL BSA. La temperatura de incubación óptima de NotI es de 37°C y la temperatura a la cual se lleva a cabo su inactivación por calor es a 80°C por 20 min. Para llevar a cabo la digestión completa de 1 µg de DNA en 16 horas a 37°C, se requiere un mínimo de 0.1 unidades de la enzima(ThermoFisher Scientific, 2018).

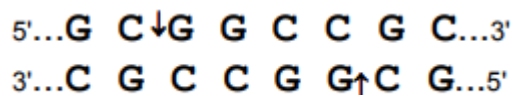


Figura 16. Sitio de reconocimiento de la enzima NotI (ThermoFisher Scientific, 2018).