



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EL PAPEL DE NIK EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA EN  
CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A

MARY JOSE ROZETE NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS:

MTRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MÉXICO, 2016.



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.

# Agradecimientos

---

Quiero empezar por las personas más importantes, mis padres Edmundo Rozete Campos y María Antonia Navarro Benítez porque siempre, a pesar de las dificultades que representó que su hija se fuera a estudiar lejos, me apoyaron incondicionalmente, sin duda todo este proceso habría sido mucho más complicado de realizar sin su ayuda. Obviamente a mis hermanas Paola y toñita (Ale) porque siempre que necesito “un paro” estoy segura que puedo contar que ambas estarán ahí haciendo equipo conmigo para enfrentar y superar cualquier situación (incluso cuando se trató de animarme con bullying para terminar mi tesis). En general a todos los “Navarro y agregados”, porque la familia siempre es el punto de partida.

De igual manera, quiero agradecer a mi amiga y asesora Karla Itzel Vázquez Santillán por su infinita tolerancia durante mi proceso de aprendizaje, por siempre ayudarme a pesar de mis múltiples errores, por todas las veces que me acompañó hasta la noche para realizar experimentos, porque además de tener una asesora encontré una amiga que no temía decirme cuando me estaba equivocando (y hacerme bullying grupal por ello), muchas gracias por todo el aprendizaje, las experiencias y las pláticas compartidas Karlita, eres la mejor asesora que he tenido.

Agradecer a mi hermano mayor en este camino Daniel, mil gracias por salvarme el pellejo más de una vez =), a mis compañeros de laboratorio: Miguel y chilanguito (Edgar) por esas múltiples sonsacadas, consejos, pláticas y risas. Laura, Luis Enrique y Gustavo muchas gracias porque cuando Karlita no estaba o estaba ocupada siempre me brindaron su ayuda y conocimiento (y también por esas cervezas de vez en cuando), a Floria por su interés y amable colaboración en el proyecto. Y por supuesto a la Dra. Vilma Maldonado por su amabilidad, paciencia y sobre todo por darme una de las enseñanzas más importantes en mi vida (nunca dejar que NADIE menosprecie el valor de mi trabajo).

No menos importante, quiero ofrecer un agradecimiento especial a Monserrat Gaspar Argote, Felipe I. Rocha González y Arni I. Estudillo Pardo por ser mis puntos de apoyo en todas esas veces en las que estuve a punto de tirar la toalla, y ya fuera con una cerveza (o más), una plática por la madrugada, un “ánimo, tú puedes, no estás sola”, o las tres al mismo tiempo =), me ayudaron a continuar y confiar en mí misma. Gracias por ser mis confidentes, cómplices, apoyo y aliados, “los quiero mil, nunca se mueran” n\_n.

A mis hermanos, amigos y todas esas personas que formaron parte de mi locura llamada “formación académica”, pero que de igual manera han impactado sobre mi formación como persona. Gracias porque quizá no estuvieron tan directamente relacionados con el procedimiento de esta tesis pero sin su esencia mi ideología sería diferente. Gracias a Leo (mi psicóloga de cabecilla), Cristina (mi igual en otro cuerpo), Yadira (mi maestra de humanidad), Borre (mi maestro de finanzas jaja), Alfredo (mi gemelito hermoso), Uriel (mi maestro en perseverancia), Samuel (que a pesar de ser mi lado Yan te agradezco y quiero mucho), a esas personitas que no por nada se cruzaron en mi camino y llegaron para quedarse: Elena, Ángeles y Liliana.

Por último, este es un reconocimiento especial a las personas con las que comenzó y terminó todo este proceso: Daniela Rodríguez Rosete y Marcos Daniel Avelar Gaytán. Porque sus partidas definieron el rumbo de mi vida. Con la primer partida quise hacer algo por ayudar y poner “un granito de arena” en el incremento del conocimiento y la esperanza frente a horribles enfermedades; con la segunda partida aprendí (muy a la mala) el respeto, la vulnerabilidad y la libertad de pensamiento.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
Cáncer .....	3
Definición de cáncer .....	3
Origen del cáncer .....	3
Capacidades distintivas del cáncer .....	3
Cáncer de mama .....	5
Cáncer de mama en México.....	5
Estadios del cáncer de mama .....	6
Clasificación molecular del cáncer de mama .....	7
Metástasis .....	9
Definición de metástasis.....	9
Etapas de la metástasis.....	9
Transición epitelio-mesénquima (TEM) .....	10
Definición de TEM.....	10
Descripción de la TEM.....	10
Principales vías metabólicas implicadas en la TEM .....	11
NF- $\kappa$ B .....	11
Factor nuclear KappaB .....	14
Vía canónica de NF- $\kappa$ B.....	14
Vía no canónica de NF- $\kappa$ B.....	14
Cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NIK).....	15
NF- $\kappa$ B y cáncer.....	15
NF- $\kappa$ B y TEM .....	16
<b>Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<b>Métodos</b> .....	<b>20</b>
Extracción y cuantificación de plásmidos .....	20
Línea y cultivo celular.....	20

Curva de selección para la concentración de antibióticos.....	21
Transfección y selección de células estables .....	22
Extracción y cuantificación de RNA.....	23
RT-PCR y PCR.....	24
Extracción y cuantificación de proteínas .....	24
Western Blot .....	25
Inmunofluorescencia.....	27
Análisis de migración.....	28
Análisis de invasión .....	29
Ensayo de degradación de gelatina .....	29
<b>Resultados</b> .....	<b>30</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>39</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>42</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>43</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>47</b>

# I. Resumen

---

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial que afecta a mujeres mayores de 20 años. En México, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor morbilidad que afecta a mujeres mayores de 20 años y la segunda causa de muerte por neoplasia. La invasión tumoral y metástasis son factores determinantes sobre la mortalidad en pacientes con cáncer de mama. A su vez, la transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso muy importante en la invasión tumoral. Se han reportado diferentes vías metabólicas activas durante la TEM, entre las que destaca la vía de NF- $\kappa$ B. La familia NF- $\kappa$ B está integrada por 5 proteínas que actúan como factores de transcripción de múltiples genes involucrados en diversos procesos celulares, y puede ser activada principalmente por dos vías: la vía canónica y la no canónica.

Estudios involucran a la vía canónica con diferentes procesos entre los que destacan respuesta inmune, inhibición de apoptosis y TEM. Sin embargo, poco se sabe de la modulación que la vía no canónica puede tener sobre estos procesos. Una molécula esencial para la activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B es la cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NIK). NIK se sobreexpresa en cáncer de mama tipo basal, el cual se caracteriza por su alto índice de invasividad y generación de metástasis. Es por eso que se planteó el objetivo de evaluar el papel de NIK sobre la transición epitelio-mesénquimal en cáncer de mama.

Para evaluar el papel de NIK en la TEM, se utilizaron células MCF-7 adquiridas de ATCC, las cuales fueron transfectadas establemente con un vector de expresión que contiene el ORF de NIK, el ORF de LacZ, o con un shRNA específico para NIK o luciferasa. Las células estables se utilizaron para determinar el nivel de expresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquimal (E-cadherina, vimentina, N-cadherina, fibronectina, snail y twist) y para analizar la capacidad de migración e invasión de las células estables.

Los resultados muestran que el incremento o disminución de la expresión de NIK modula la expresión de los marcadores de TEM. La expresión forzada de NIK resultó en un aumento en los niveles de expresión de N-cadherina, vimentina, fibronectina, snail, twist, y provocó una disminución en la expresión de E-cadherina. Por el contrario, la inhibición de NIK provocó una disminución en los niveles de N-cadherina, vimentina, fibronectina, snail y twist; e incrementó la expresión de E-cadherina.

Estos resultados sugieren que NIK promueve la expresión de marcadores mesénquimales y la disminución de marcadores epiteliales. De igual manera, las células que sobreexpresan NIK tienen una mayor capacidad de migración, degradación e invasión, mientras que las células con NIK inhibido, disminuyen estas capacidades.

NIK no sólo regula la expresión de moléculas involucradas en la transición epitelio-mesénquimal, sino que también favorece la capacidad de migración e invasión y origina una morfología tipo mesénquimal en células de carcinoma mamario MCF-7.



# II. Introducción

---

## *Cáncer*

### Definición de cáncer

Cáncer es un término utilizado para referirse a un conjunto de diversas anomalías relacionadas con la fisiología y el control del ciclo celular. Afecta células de cualquier parte del cuerpo generando descontrol principalmente en los procesos de apoptosis, proliferación e invasión celular (OMS 2016).

### Origen del cáncer

El cáncer inicia en la unidad básica de la vida, la célula. El cuerpo está formado de muchos tipos de células que crecen y se dividen en una forma controlada para producir nuevas células. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, algunas veces el ciclo celular se descontrola debido a mutaciones en la información genética de la célula afectando su crecimiento y división normal, provocando un cúmulo celular nombrado tumor (ACS, 2016).

### Capacidades distintivas del cáncer

El cáncer presenta heterogeneidad celular y molecular que dificulta la elección de un tratamiento adecuado. Sin embargo, las células neoplásicas de un tumor presentan diez capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del tumor que constituyen la base para entender la fisiología de las neoplasias. Estas capacidades pueden complementarse entre sí favoreciendo el crecimiento y diseminación del tumor (Figura 1) (Hanahan & Weinberg 2011).

1) **Inestabilidad y mutación del genoma:** Mutaciones adquiridas debido a la sensibilidad a agentes mutagénicos y/o por fallas en uno o varios componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico. Fallas en los genes que mantienen la integridad genómica, predisponen a las células a adquirir deleciones o amplificaciones genómicas que favorecen el desarrollo de un fenotipo neoplásico.

- 2) **Reprogramación del metabolismo energético:** Las células cancerosas limitan su metabolismo energético a glucólisis anaerobia (formación de ácido láctico) y poseen una disminución en la capacidad de incorporar Piruvato a la mitocondria para continuar la formación de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Como consecuencia, la formación de ATP disminuye aproximadamente 18 veces provocando un incremento en la expresión de transportadores de glucosa (Glut1), el cual se encuentra asociado con la activación del oncogen Ras.
- 3) **Señalización proliferativa constante:** Inducción de crecimiento y proliferación celular crónica debido a mutaciones que alteran la homeostasis del ciclo celular e inducen la sobreexpresión de factores de crecimiento.
- 4) **Evasión de supresores de crecimiento:** Las células cancerosas no pueden controlar la proliferación y pierden la capacidad de activar la senescencia e inducir apoptosis debido a modificaciones en genes supresores de tumor como TP53.
- 5) **Resistencia a muerte celular:** Generalmente las células neoplásicas presentan disminución o mutación de TP53, sobreexpresión de inhibidores de apoptosis como BCL2, o incremento de señales de supervivencia (Igf1/2) que disminuyen la expresión de factores proapoptóticos como Bax, Bim y PUMA.
- 6) **Inmortalidad replicativa:** La sobreexpresión de la proteína telomerasa mantiene los telómeros de una longitud suficiente para evitar la senescencia y/o apoptosis. En menor frecuencia, los telómeros pueden mantenerse por recombinación alternativa.
- 7) **Inflamación:** La infiltración en el tumor de células del sistema inmune innato (linfocitos B-T y células asesinas naturales -NK-) originan inflamación, la cual contribuye en la activación de factores de crecimiento y proangiogénicos que modifican el microambiente del tumor favoreciendo el desarrollo y progresión tumoral.
- 8) **Evasión de destrucción inmune:** Las células cancerosas esquivan el sistema inmune gracias a la activación de moléculas inmunosupresoras entre las que destaca TGF $\beta$ .
- 9) **Inducción de angiogénesis:** Se desarrollan nuevos vasos sanguíneos asociados al tumor que favorecen su desarrollo con nutrientes y oxígeno, así como remueven de él los desechos metabólicos y dióxido de carbono.

10) **Activación de invasión y metástasis:** Se origina una sobreexpresión de moléculas señalizadoras que provocan la pérdida de unión célula-célula y permiten la movilidad celular. El principal responsable conocido es TGF $\beta$ , el cual tiene la capacidad de inducir transición epitelio-mesénquimal para permitir la invasión y metástasis tumoral.



Figura 1. Capacidades biológicas distintivas del cáncer (Editado: Hanahan & Weinberg, 2011).

## *Cáncer de mama*

### Cáncer de mama en México

En México, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor morbilidad (29%) que afecta a mujeres mayores a 20 años. Las tasas de mortalidad de este cáncer incrementan conforme a la edad (Figura 2) y es la segunda causa de muerte por neoplasias, superado por el cáncer de pulmón. Cerca del 30% de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama desarrollan metástasis y aproximadamente el 5% son diagnosticadas en estadios avanzados (INEGI, 2015; Gupta *et al.* 2014).

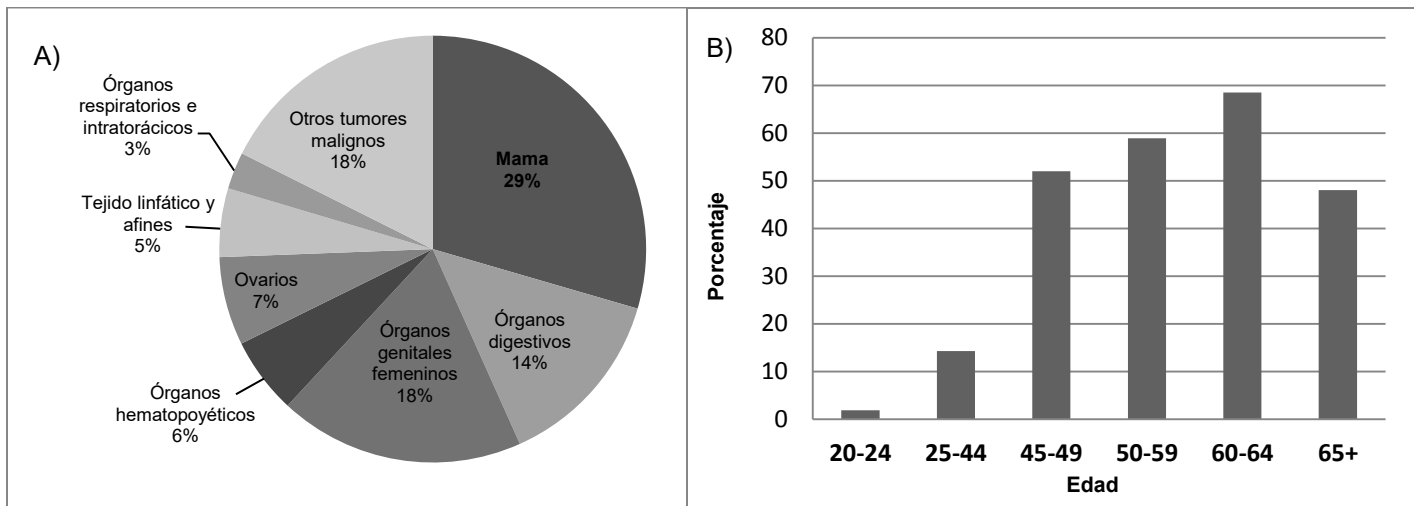


Figura 2. A) Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más por neoplasias en México. B) Incidencia del cáncer de mama en mujeres de 20 años y más, por grupo de edad en el 2014 (Editado: INEGI 2014).

## Estadios del cáncer de mama

El cáncer de mama se clasifica en cinco estadios que van del 0 al IV de acuerdo a su progresión tumoral (Novartis, 2013).

### Estadio 0

- 1. Carcinoma ductal *in situ*:** El cáncer se origina en los conductos mamarios y sólo invade tejidos de la mama.
- 2. Carcinoma lobulillar *in situ*:** Las células cancerosas están únicamente en los lobulillos de la mama y rara vez puede volverse invasivo.

### Estadio I

- **IA:** El tumor mide 2 cm o menos y se mantiene dentro del tejido de la mama
- **IB:** El tumor mide 2 cm o menos y se encuentran células cancerosas en ganglios linfáticos adyacentes.

### Estadio II

- **IIA:** El tumor puede o no estar y hay racimos de células cancerosas menores a 2 mm en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares.

- **IIB:** El tumor mide más de 2 cm y se encuentran racimos celulares en 1 a 3 ganglios adyacentes.

### **Estadio III**

- **IIIA:** El tumor puede tener cualquier tamaño o no estar presente en mama y hay racimos celulares de cáncer mayores a 2 mm en ganglios adyacentes.
- **IIIB:** El cáncer se diseminó a la pared torácica, ganglios adyacentes o a la piel provocado inflamación y/o úlcera.
- **IIIC:** Se encuentran células cancerosas en los ganglios situados por encima y debajo de la clavícula.

### **Estadio IV**

- **Cáncer metastásico:** El cáncer se diseminó a otros órganos del cuerpo. Principalmente a los huesos, pulmones, hígado y cerebro.

## Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama se divide en varios grupos, siendo la expresión del receptor de estrógenos (RE) el principal factor discriminante (Fan et al. 2006; Zepeda-Castilla et al. 2008)

### **RE (+)**

- **Luminal A:** Presenta elevados niveles de expresión de genes relacionados con el RE y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. También expresa receptor de progesterona (RP).
- **Luminal B:** Expresa los receptores hormonales (RE y RP) y HER2. Al contrario del luminal A, la expresión de genes relacionados con el RE es baja y presenta una elevada expresión de genes proliferativos. Es de menor pronóstico para el paciente en comparación al luminal A debido al incremento en la resistencia a fármacos (Sorlie et al. 2003).

### **RE (-)**

- **HER2/neu o ERBB2:** Presenta baja expresión de RE y genes relacionados. Se caracteriza por tener alta expresión del protooncogén ERBB2 y una proporción de mutaciones mayor al 40% en p53.

Es de pobre pronóstico para el paciente, sin embargo, muestra alta sensibilidad a quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, taxanos y Trastuzumab (anticuerpo monoclonal antiHER2).

- **Tipo basal o triple negativo:** Se caracteriza por tener un patrón de expresión similar al de las células epiteliales basales y carecer de la expresión de RE, RP y HER2. Este subtipo expresa citoqueratinas 5/6 y HER1, y presenta mutaciones en el gen BRCA1, además la baja regulación de BCRA1 está asociada a la sobreexpresión de P53 y el crecimiento anormal de las células. Estos tumores tienen el peor pronóstico debido a mutaciones de alto grado en p53, resistencia a quimioterapias convencionales y alta capacidad de metástasis.

Existe un subtipo molecular de cáncer de mama nombrado **Cáncer de mama tipo normal (Normal-like)**, el cual presenta un perfil de expresión genética similar a las células normales de los conductos mamarios y generalmente no origina una respuesta patológica completa, sin embargo, representa entre el 1 y 4% de los tumores en mama (Rouzier et al. 2005) (Figura 3).

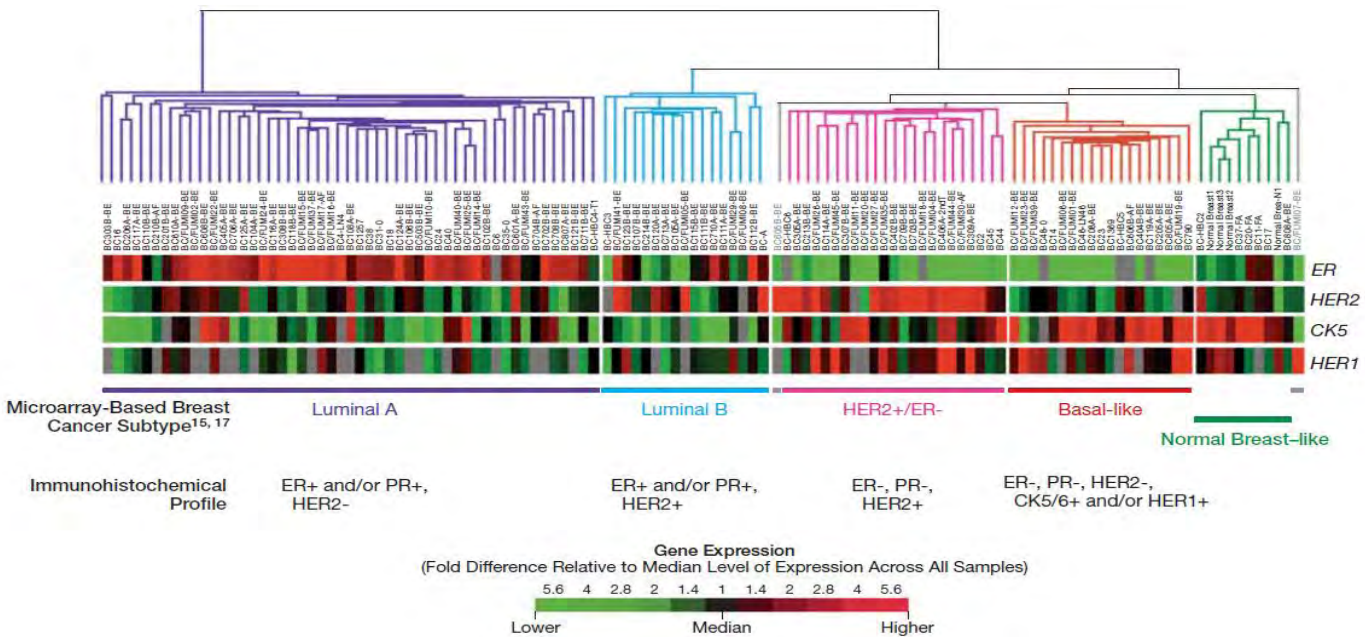


Figura 3. Perfil de expresión de receptor de estrógenos (ER), HER2, Citoqueratina 5 (CK5) y HER1 en los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama (Sorlie et al. 2003).

## *Metástasis*

### Definición de metástasis

Se nombra metástasis al proceso donde las células cancerosas se diseminan y forman nuevos tumores en órganos o tejidos distantes, generalmente se transportan a través de la sangre o el sistema linfático, sin embargo, la metástasis inicia con una invasión de tejidos próximos al tumor primario (Arvelo & Poupon 2001).

### Etapas de la metástasis

La metástasis es un proceso que consta de cinco pasos, los cuales son independientes del tamaño del tumor o estadio del cáncer.

**1.- Infiltración local de células tumorales en tejidos adyacentes.** Este paso inicia con la separación de células cancerosas del tumor primario debido a la pérdida de uniones adherentes y la expresión de un perfil genético que favorece la movilidad celular. Existen diferentes procesos que favorecen la infiltración local de células cancerosas (Van Zijl et al. 2011).

**2.- Supervivencia en el sistema circulatorio.** Las células epiteliales pueden sufrir *anoikis*, una forma de apoptosis que tiene lugar cuando las células pierden contacto con el sustrato de anclaje. Las células tumorales migratorias evaden la muerte por *anoikis* y esquivan el daño por parte de las células del sistema inmune al generar agregados plaquetarios a su alrededor facilitando su adhesión a la pared de los pequeños vasos y creando un ambiente protector contra los mecanismos defensivos biológicos.

**3.- Intravasación.** Se origina con la migración transendotelial de células cancerosas hacia el sistema circulatorio. Las células pueden llegar a él a través de ganglios linfáticos adyacentes, así como capilares y vasos formados por angiogénesis del tumor primario. Las células migratorias deben poseer la capacidad de degradar la matriz extracelular y membrana basal a través de la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Sahai 2005).

**4.- Extravasación.** Las células cancerosas salen del sistema circulatorio en un tejido u órgano distante al tumor primario. El sistema circulatorio determina los posibles sitios de

invasión debido a que el movimiento de las células migratorias es favorecido por el flujo sanguíneo (Chambers et al. 2002).

**5.- Establecimiento de un tumor secundario.** Una vez que las células cancerosas llegan a un tejido u órgano nuevo activan su señalización proliferativa e inducen angiogénesis. El establecimiento de tumores secundarios es la fase clínica nombrada metástasis.

La capacidad de metástasis de un tumor es determinante en la mortalidad de los pacientes con cáncer y se ha establecido que la etapa inicial (la separación de células del tumor primario) es la que mayor impacto tiene en la diseminación de la neoplasia. El cáncer de mama tiene la característica de diseminarse desde estadios tempranos y generalmente lo hace hacia pulmones, huesos, hígado y cerebro (Schmidt-Kittler et al. 2003; Chambers et al. 2002).

Diversos estudios han demostrado que las células neoplásicas migratorias sufren la pérdida de proteínas de unión adherente y presentan un patrón de expresión genética similar a células mesénquimales. Al proceso mencionado se le conoce como transición epitelio-mesénquima (Thiery et al. 2009; May et al. 2011; Huber et al. 2004).

### *Transición epitelio-mesénquima (TEM)*

#### Definición

La TEM es un proceso morfogenético coordinado que se lleva a cabo en algunos procesos patológicos como la carcinogénesis. Consiste en la transformación de células epiteliales hacia un fenotipo mesénquimal. Las células pierden la polaridad celular y adhesión célula-célula, y adquieren características como resistencia a apoptosis, movilidad y capacidad de invasión (Polyak y Weinberg 2009).

#### Descripción de la TEM

La TEM se caracteriza por la pérdida de la expresión de E-cadherina debido a la acción de diferentes factores de transcripción entre los que destacan snail y twist. Estos factores de transcripción actúan reprimiendo el promotor del gen CDH1 (Kalluri & Weinberg 2009).

La represión de CDH1 continúa con una reorganización del citoesqueleto donde los filamentos intermedios de citoqueratina son reemplazados por vimentina, esto provoca un cambio en la morfología celular e incrementa la capacidad de invasión (Zeisberg & Neilson 2009). De igual



manera, se ha observado que durante la transición se origina un cambio en la expresión de cadherinas, sustituyéndose a E-cadherina por N-cadherina (Thiery et al. 2009; Kuphal & Bosserhoff 2006).

### Principales vías metabólicas implicadas en la TEM

La TEM puede ser activada por una gran variedad de estímulos extracelulares entre los que destacan el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF\beta$ ), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el microambiente hipóxico. Estos estímulos disparan una multitud de vías de transducción de señales que convergen en varios factores de transcripción como snail, zeb1, zeb2 y twist (May et al. 2011).

La vía más estudiada debido a su estrecha relación con la inducción de TEM es  $TGF\beta$ . Se ha demostrado que este factor induce la TEM a través de distintos mecanismos de señalización incluyendo la fosforilación de factores de transcripción como SMAD y snail, así como puede influir en la actividad de Notch y Wnt (Thiery et al. 2009).

Snail es el factor de transcripción más relacionado con la represión del promotor de CDH1. Sin embargo, también se ha demostrado que actúa como activador transcripcional de vimentina, fibronectina y algunas metaloproteinasas de matriz (MMPs) que favorecen el fenotipo invasivo en células neoplásicas (Zeisberg & Neilson 2009).

Otra de las vías relacionadas con la activación de la TEM es  $NF-\kappa B$ . Huber y colaboradores demostraron que la vía canónica de  $NF-\kappa B$  tiene la capacidad de activar y mantener la TEM inducida por  $TGF\beta$  en un modelo combinado de carcinogénesis mamaria (EpRas) (Huber et al. 2004).

### *NF- $\kappa B$*

#### Factor nuclear KappaB (NF- $\kappa B$ )

La familia Rel/ $NF-\kappa B$  es un grupo de factores de transcripción con la capacidad de regular genes relacionados con procesos de respuesta inmune e inflamatoria, apoptosis, crecimiento y adhesión celular. Diversos estudios han involucrado la vía con enfermedades neurodegenerativas, del corazón, asma, artritis y cáncer (Napetschnig & Wu 2013).

En mamíferos, las proteínas Rel/NF- $\kappa$ B están divididas en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de un dominio de transactivación (TSA). El grupo con TSA está formado por P65 (RelA), RelB y c-Rel; mientras que las proteínas NF- $\kappa$ B1 (P105-P50) y NF- $\kappa$ B2 (P100-P52) carecen del dominio TSA. Todas las proteínas comparten un dominio altamente conservado de ~300 aminoácidos en la región N-terminal denominado dominio homólogo a Rel (Rel Homology Domain [RHD]), en el que se encuentran los dominios de unión a DNA, dimerización y la señal de localización nuclear (Nuclear Localization signal [NLS]) (Figura 4) (Gilmore 2006; Sullivan et al. 2007).

NF- $\kappa$ B se encuentra de manera basal en forma de homo o heterodímeros inactivos por interacción con moléculas inhibitoras llamadas IKBs, las cuales poseen varios repetidos de Ankirina que ocultan los dominios NLS y TSA manteniendo al dímero en el citoplasma. Los homodímeros de las proteínas NF- $\kappa$ B1 y NF- $\kappa$ B2 no tienen acción transcripcional debido a la falta de dominio TSA, y cuando estas proteínas se encuentran unidas a una que posee dominio TSA necesitan que el proteosoma degrade la secuencia de repetidos tipo Ankirina que presentan en su extremo C-terminal para migrar a núcleo y servir como factor transcripcional (Sun 2002).

La inducción de la vía NF- $\kappa$ B se puede generar a partir de diferentes estímulos entre los que destacan las citocinas proinflamatorias, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana de algunos virus, hongos y otros parásitos eucariontes, así como condiciones de estrés fisiológico, factores de crecimiento, agentes químicos y más; es por eso que se define como un factor de transcripción nuclear con expresión ubicua (Delhalle et al. 2004).

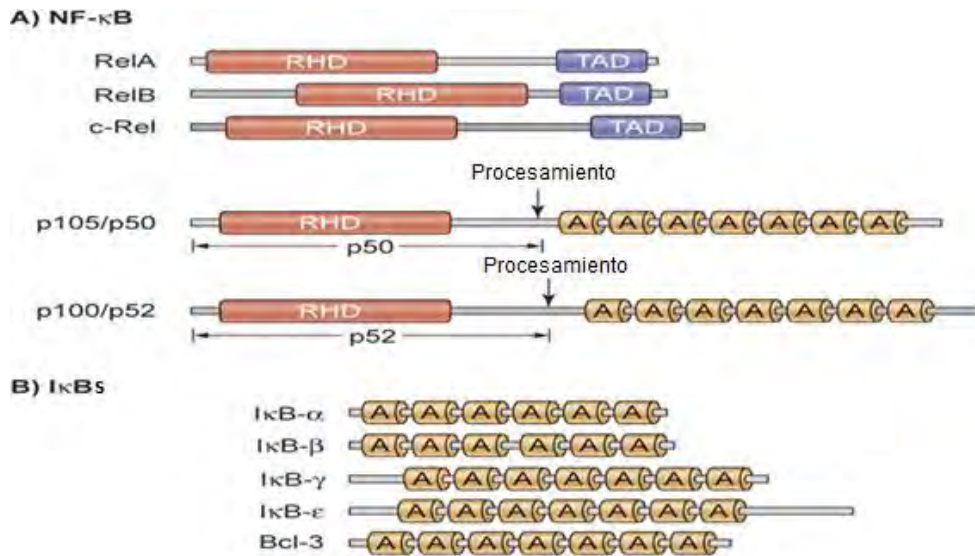


Figura 4. A) Dominios Rel de la familia REL-NF- $\kappa$ B. Se observan en los extremos C-terminal de las proteínas Rel un dominio de transactivación (TAD) mientras que las proteínas NF- $\kappa$ B contienen una secuencia de repetidos de Ankirina similar a la presente en las proteínas inhibidoras (B) (Editado: Polyak & Weinberg, 2009).

La señalización a través de NF- $\kappa$ B tiene dos principales vías de activación, la vía canónica y la no canónica, ambas actúan por fosforilación, ubiquitinación y degradación de sus inhibidores (IKBs), provocando la exposición de los dominios de unión al DNA, NLS y TSA. La exposición de los dominios induce la translocación del dímero al núcleo y la transcripción de genes que poseen una pequeña secuencia (9-10 pb) nombrada “sitio  $\kappa$ B” (Figura 5) (Hoffmann et al. 2006).

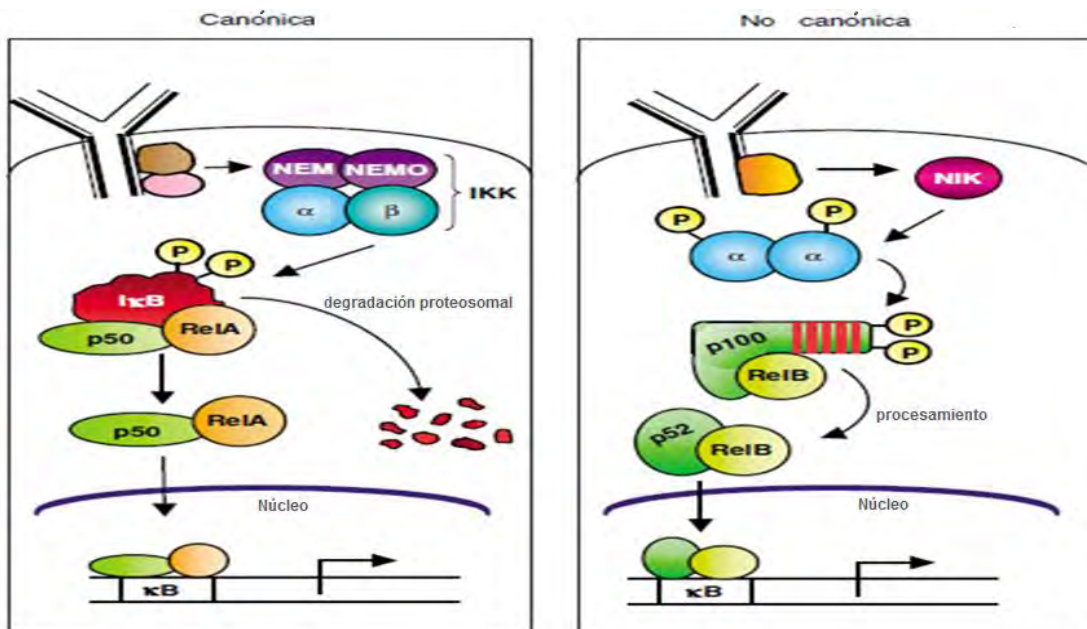


Figura 5. Principales vías de activación de NF- $\kappa$ B (Editada: Viennois et al. 2013)

## Vía canónica

La vía canónica está asociada a receptores como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ R, TGF- $\alpha$ , tipo Toll (TLRs) entre otros, y tienen como ligandos una gran variedad de moléculas entre las que destacan citosinas proinflamatorias, lipopolisacáridos y factores de crecimiento. La unión de un ligando al receptor de membrana desencadena una cascada de señalización que activa un complejo formado por dos cinasas funcionales (IKK $\alpha$ -IKK $\beta$ ), y una subunidad regulatoria llamada NEMO (IKK $\gamma$ ). El complejo de IKKs fosforila a I $\kappa$ B en los residuos de Serina 32 y 36, provocando su ubiquitinación, degradación proteosomal, y liberando al dímero Rel/NF- $\kappa$ B (generalmente P65/P50) para su translocación al núcleo e inducción transcripcional de genes blanco (Sun 2002).

## Vía no canónica

La vía no canónica se encuentra principalmente asociada a los receptores LT $\beta$ 1, CD40 y BAFF-R y sus ligandos específicos. La unión del ligando al receptor activa a la cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NIK), la cual fosforila al dímero de IKK $\alpha$ / $\alpha$  (Ramakrishnan et al. 2004). Esta vía se considera independiente de I $\kappa$ Bs y el dímero característico de la vía es P100/RelB. P100 actúa como inhibidor de la vía debido a que necesita pasar por un proceso de degradación proteosomal parcial para cambiar a su forma activa P52/RelB (Vallabhapurapu y Karin 2009).

La cascada de señalización de la vía no canónica se considera dependiente de la cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NIK), la cual actúa sobre P100 a través de un complejo IKK $\alpha$ / $\alpha$ . Se ha visto que NIK tiene la capacidad de fosforilar a P100 sin el complejo IKK $\alpha$ / $\alpha$  como intermedirario, así como de interactuar con la vía canónica por medio de los receptores CD70 y CD27, los cuales inducen que NIK fosforile la región  $\alpha$  del complejo IKK $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  (Xiao et al. 2001; Qing & Xiao 2005; Gerondakis et al. 2006; Gye et al. 2006).

## *NIK*

La cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NIK), es una proteína MAP cinasa-cinasa-cinasa codificada por el gen MAP3K14 situado en la región q21.31 del Cromosoma 17. La cinasa está formada por cuatro dominios que le permiten interactuar con otras moléculas (Thu & Richmond 2012).

La región C-terminal de NIK permite la interacción con sustratos como IKK $\alpha$  y P100, así como con moléculas que regulan su acción (TRAF 1, 2, 5 y 6). La región N-terminal regula la estabilidad de la proteína por interacción con TRAF 3 (Gye et al. 2006; Zarnegar et al. 2008) (Figura 6).

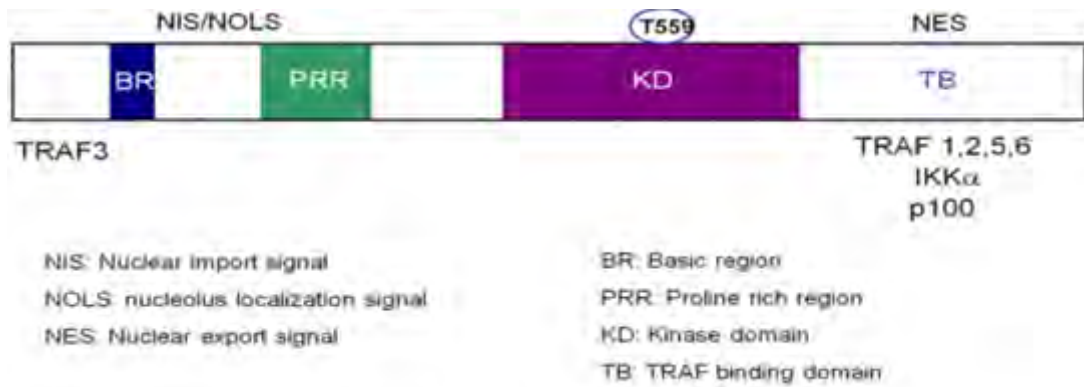


Figura 6. Dominios dentro de la proteína NIK.

Hasta ahora se ha encontrado un sitio de fosforilación (Thr-559) para NIK perteneciente a su dominio cinasa. Dentro de la región N-terminal se sitúan algunas secuencias señalizadoras de importación y exportación nuclear (NIS y NES, respectivamente), así como de localización nucleolar (NOLS) las cuales permiten a la proteína desplazarse entre estos compartimentos celulares (Birbach *et al.*, 2004).

Takeda y colaboradores (2016) han reportado que el decremento en los niveles de NIK favorece la apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple. A su vez, Zhang y colaboradores (2015) encontraron que NIK se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes con cáncer de mama y muestra una correlación con la metástasis hacia ganglios linfáticos, así como con el estadio clínico de los pacientes. A pesar de que NIK puede activar la señalización río abajo de receptores de la vía canónica, su acción se considera esencial únicamente para la activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B (Ramakrishnan *et al.*, 2004).

### *NF- $\kappa$ B y Cáncer*

El descubrimiento de la oncoproteína viral V-Rel en pollos jóvenes introdujo el papel de NF- $\kappa$ B en la carcinogénesis. Posteriormente se demostró el papel de NF- $\kappa$ B en la supresión de apoptosis, la progresión del ciclo celular, angiogénesis y migración celular (Orlowski & Baldwin 2002; Kim *et al.* 2003)

NF- $\kappa$ B juega un papel importante en la iniciación y progresión de tumores epiteliales al promover la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, apoptosis, citosinas proinflamatorias y reguladores del ciclo celular favoreciendo la transformación de las células hacia un fenotipo neoplásico (Kreuz et al. 2001; deGraffenried et al. 2004).

NF- $\kappa$ B está involucrado en diversos tipos de cáncer esporádicos y asociados a inflamación (Xiao & Fu 2011; Hoesel & Schmid 2013). Se ha relacionado la expresión constitutiva de NF- $\kappa$ B con la resistencia a fármacos y la capacidad invasiva en subtipos moleculares de cáncer de mama carentes del receptor de estrógenos (RE-) (Nakshatri et al. 1997).

### *NF- $\kappa$ B y la TEM*

La vía canónica de NF- $\kappa$ B es necesaria para la inducción y mantenimiento de la TEM. NF- $\kappa$ B actúa en conjunto con el oncogen RAS para evitar la inducción de apoptosis mediada por TGF- $\beta$  favoreciendo la invasión y metástasis (Nakshatri et al. 1997; Morel et al. 2008). Sin embargo, en cáncer de mama se ha observado que NF- $\kappa$ B es capaz de inducir y mantener la TEM en ausencia de TGF $\beta$  (Huber et al. 2004).

Diversos estudios en cáncer de mama demuestran que la expresión de proteínas intermediarias de la vía clásica de NF- $\kappa$ B (P65) se encuentra relacionada con la activación y expresión de otros factores de transcripción como twist, snail, zeb1 y zeb2 (Chua et al. 2007). Además, la expresión de Twist se encuentra directamente relacionada con la señalización inducida por TNF $\alpha$ , lo cual favorece la progresión tumoral (Sahai 2005; Wei et al. 2011).

Se conoce la acción de p50 y p65 sobre la regulación de factores de transcripción que inducen la pérdida de adhesión celular, la expresión de metaloproteinasas de membrana (MMP-9 y MMP-2), y favorecen la migración e invasión celular (Andela et al. 2000; Huang et al. 2001; Carey et al. 2006; Shook & Keller 2003; Xie 2015). Sin embargo, se desconoce si la activación de los factores de transcripción y moléculas involucradas en la TEM podría ser regulada por la señalización no canónica de NF- $\kappa$ B, es por eso que se propone evaluar la acción de NIK sobre la inducción de la TEM en un modelo *in vitro* de cáncer de mama.

### III. Justificación

---

El cáncer de mama representa la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mexicanas mayores a 20 años. Una de las principales causas del fracaso en los tratamientos se debe a la capacidad de este tipo de cáncer de invadir tejidos adyacentes desde etapas iniciales. La metástasis es determinante sobre la mortalidad de las pacientes con cáncer de mama y se inicia con la pérdida de uniones adherentes entre células del tumor primario, las cuales adquieren un fenotipo migratorio similar a células mesenquimales, a este proceso se le denomina transición epitelio-mesénquima.

Existen diversos estudios que han demostrado algunas vías de señalización implicadas en la activación y mantenimiento de la TEM, entre las principales vías se encuentran TGF- $\beta$  y NF- $\kappa$ B. Sin embargo, todos los estudios relacionados a NF- $\kappa$ B se encuentran enfocados a la vía canónica. Se ha observado que NIK (cinasa esencial de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B) se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama tipo basal, el cual se caracteriza por una baja prognosis debido a su alta capacidad de metástasis y resistencia a fármacos. Por ello, se pretende evaluar el papel de NIK en la TEM.

## IV. Hipótesis

---

La inducción de NIK en células MCF-7 podría incrementar la expresión de marcadores mesenquimales y disminuir los niveles del marcador epitelial E-cadherina. A su vez, la disminución de NIK podría incrementar la expresión del marcador epitelial y disminuir los niveles de marcadores mesénquimales. Además, si NIK es capaz de regular la expresión de proteínas involucradas en la TEM, se espera que haya un incremento en las capacidades de migración e invasión cuando NIK se encuentra sobreexpresado en células MCF-7.



# V. Objetivos

---

## General

- ❖ Evaluar el papel de NIK en la transición epitelio-mesénquima en células de carcinoma mamario MCF-7.

## Particulares

- Determinar si la sobreexpresión de NIK origina un incremento de los marcadores mesenquimales vimentina, snail, N-cadherina, twist y fibronectina, y si este tiene efecto sobre el marcador epitelial E-cadherina en células MCF-7.
- Analizar la expresión de los marcadores de transición epitelio-mesénquima: E-cadherina, vimentina, snail, N-cadherina, twist y fibronectina cuando los niveles de NIK son disminuidos.
- Establecer la capacidad de migración e invasión de las células MCF-7 cuando NIK se encuentra sobreexpresado e inhibido.

# VI. Métodos

---

## *Extracción y cuantificación de Plásmidos*

Se utilizaron plásmidos pSIREN-RetroQ y pTREX-DEST30 que habían sido clonados respectivamente con shRNA (short hairpin RNA) dirigido contra NIK y el marco de lectura abierta (ORF) para la cinasa NIK. Como controles se utilizaron el mismo tipo de plásmidos clonados con shRNA para luciferasa y el ORF del gen bacteriano LacZ respectivamente.

Los plásmidos contienen genes que confieren resistencia a ampicilina, lo cual permite seleccionar a las bacterias que contienen al plásmido de interés. Las bacterias fueron cultivadas en placas de 100mm<sup>2</sup> de agar Luria Bertani (LB) con 100ug/ml de ampicilina. Las cepas fueron incubadas a 37° C durante 16 horas. Posteriormente, se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en 3 ml de medio LB Broth estéril con 100ug/ml de ampicilina. El inóculo fue incubado durante 3 horas a 37°C en agitación de 300 RPM. El cultivo fue vaciado en matraces Erlenmeyer con 200 ml de medio LB Broth estéril con ampicilina y fue incubado bajo las mismas condiciones durante 14 horas.

Para realizar la extracción del plásmido, se siguió el protocolo HiSpeed Plasmid Midi Kit de QIAGEN (# cat.12643). Una vez realizada la extracción, se cuantificó la concentración del plásmido (ng/μl) utilizando NanoDrop.

## *Línea y cultivo celular*

Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7, obtenida de la compañía ATCC (American Type Culture Collection).

Las células fueron cultivadas en placas de 100mm<sup>2</sup> (Corning NY, USA) con 6 ml medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) e incubadas en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C.

El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 horas hasta obtener una confluencia celular de 70% a 80%. Una vez obtenida la confluencia, las células fueron despegadas con tripsina (al 0.025% en PBS (Phosphate-buffered saline) y 1mM de EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), y centrifugadas a 2000 revoluciones por minuto (RPM) durante dos minutos a temperatura ambiente, el

sobrenadante fue removido y el pellet resuspendido en 2 ml de medio de cultivo para su conteo. El conteo celular se realizó utilizando cámara de Neubauer.

Todos los métodos de cultivo celular fueron realizados en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar previamente radiada con luz ultravioleta durante 20 minutos limpiando todo con etanol al 70%.

### *Curva de selección para la concentración de antibióticos*

Los plásmidos pSIREN-RetroQ y pTREX-DEST30 contienen genes de resistencia a puromicina o Geneticina respectivamente. Para determinar la concentración mínima de antibiótico necesaria para matar a todas las células MCF-7 que carecen del plásmido, se realizaron curvas de selección en placas de 24 pozos.

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron con 500  $\mu$ l de medio de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 60%. Una vez obtenida la confluencia, se comenzó a colocar puromicina y geneticina (G418) en las concentraciones indicadas en la tabla 1. La selección se realizó durante 10 días reemplazando el medio y antibiótico cada 48 horas.

Tabla 1. Concentraciones de antibiótico utilizadas para la curva de selección

<b>Antibiótico</b>			<b>Antibiótico</b>		
<b>Placa 1</b>	<b>Concentración</b>	<b># de pozos</b>	<b>Placa 2</b>	<b>Concentración</b>	<b># de pozos</b>
<b>Puromicina</b>	100ng/ml	3	<b>Geneticina</b>	300 $\mu$ g/ml	3
	200ng/ml	3		400 $\mu$ g/ml	3
	300ng/ml	3		500 $\mu$ g/ml	3
	400ng/ml	3		600 $\mu$ g/ml	3
	500ng/ml	3		700 $\mu$ g/ml	3
	600ng/ml	3		800 $\mu$ g/ml	3
	700ng/ml	3		900 $\mu$ g/ml	3
	Control	3		Control	3

### *Transfección y selección de células estables*

La transfección se llevó a cabo en placas de 6 pozos (Corning, USA). Fueron sembradas 500,000 células en medio EMEM e incubadas por 24 horas. La transfección se realizó a una confluencia celular aproximada al 90% utilizando 3µg de plásmido y 2.5 µg de lipofectamina 2000 por cada microgramo de DNA.

Las células se incubaron durante 24 horas con la mezcla de transfección en medio bajo en suero (Opti-MEM®). Para medir la eficiencia de transfección se utilizó la proteína verde fluorescente (GFP), midiendo con citometría de flujo la fluorescencia de las células transfectadas con GFP a las 48 horas.

La selección de células estables se comenzó 48 horas después de la transfección, se utilizaron 700ng/ml de Puromicina para las células transfectadas con pSIREN y 500µg/ml de Geneticina para las células transfectadas con pT-REX-DEST30. La placa se mantuvo en incubación durante 21 días reemplazando el medio y colocando nuevo antibiótico cada 48 horas.

Al transcurrir los 21 días, las células seleccionadas para cada condición fueron tripsinizadas y cultivadas en tres cajas de 65mm<sup>2</sup> para realizar la extracción de RNA, proteínas e Inmunofluorescencias, así como congelar células para los ensayos de migración, degradación e invasión celular. Se realizaron tres líneas independientes de células estables.

La línea parental y las células transfectadas con proteína verde fluorescente (GFP) fueron tripsinizadas y se cuantificó la fluorescencia de ambas para medir la eficiencia de transfección (Figura 7).

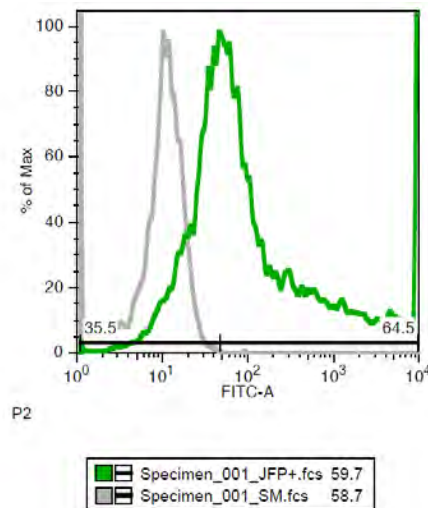


Figura 7. La eficiencia de transfección se cuantificó utilizando citometría de flujo para comparar la fluorescencia basal de las células MCF-7 y las transfectadas con GFP. La eficiencia de tranfección obtenida fue de 64.5%.

### *Extracción y cuantificación de RNA*

Las células fueron desprendidas utilizando un mililitro de medio de cultivo y raspando con un gendarme estéril, posteriormente se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml para ser centrifugadas durante 2 minutos a 2000 RPM en temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el pellet fue disuelto en 500 µl de Trizol (Invitrogen) e incubado 10 minutos en hielo.

Posteriormente se agregaron 100 µl de Cloroformo y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, para después ser centrifugada a 10000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Se recuperaron 200 µl de la fase acuosa en un nuevo tubo, se le agregó la misma cantidad de Isopropanol previamente enfriado y se incubó a -20°C durante 10 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a 10000 RPM, al terminar el tiempo de centrifugación, se decantó el Isopropanol y se realizaron 3 lavados al pellet con etanol al 70% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y centrifugando a 7500 RPM durante 5 minutos y 4°C. Por último, se retiró todo el etanol y el pellet fue resuspendido en 30 µl de agua MiliQ estéril.

El RNA se cuantificó en un NanoDrop verificando la relación 260/280 para evaluar su pureza (entre 1.8 y 2) y se corrió en un gel desnaturalizante de agarosa para revisar su integridad.

## *RT-PCR y PCR*

El cDNA se generó a partir de 2 µg de RNA siguiendo el protocolo del Kit de transcriptasa reversa Superscript de Invitrogen (USA). Posteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para vimentina, E-cadherina y snail diseñados en “Primer Design Tool” de la plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las características de cada reacción se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características de oligonucleótidos utilizados.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de oligonucleótidos</b>	<b>Temperatura de elongación (Tm)</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Longitud del fragmento</b>
<b>NIK</b>	5'TTAGAAACACCCCGCAGTTC 3' 5'CCACACGTGGTTCAGACAT3'	56°	30	153 pb
<b>E-cadherina</b>	5'CCTGGGACTCCACCTACAGA3' 5'TGGATTCCAGAAACGGAGGC3'	56°	28	103 pb
<b>Vimentina</b>	5'TGGCCGACGCCATCAACACC3' 5'GTCCTCGGCCAGGTTGTCGC3'	64°	35	281 pb
<b>Snail</b>	5'CCTGCTGGCAGCCATCCCAC3' 5'TCCTGGAGCCGAAGGGAGGC3'	64°	40	126 pb

## *Extracción y cuantificación de proteínas*

Las células fueron lavadas con PBS frío y posteriormente fueron lisadas con buffer RIPA 1X adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas al 1X. Las proteínas fueron incubadas 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min para eliminar los restos celulares y conservar el extracto soluble.

El sobrenadante obtenido fue cuantificado utilizando el Kit Bradford (DC protein assay, BioRad) y la absorbancia se leyó en un multidetector (Beckam Coulter, DTX 880). Para la cuantificación proteica, se realizó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de la proteína gama

globulina (0.2  $\mu$ g-1.2  $\mu$ g). La concentración de proteína en las muestras se determinó con la interpolación de datos en la curva estándar y empleando la ecuación de la recta.

### *Western Blot*


Se colocaron 30  $\mu$ g de proteínas en tubos Eppendorf rotulados de acuerdo al tratamiento correspondiente. Las proteínas fueron resuspendidas en 1X Laemmli buffer y posteriormente se calentaron a 94°C durante 5 minutos.

Pasados los 5 minutos, las proteínas se colocaron en hielo y se depositaron en geles de poliacrilamida al 8% junto con un marcador de peso molecular kaleidoscope protein ladder. La electroforesis SDS-PAGE se realizó a 130 Voltios y 20 mA.

Transcurrida la electroforesis, el gel fue lavado dos veces en buffer de transferencia 1x (24mM de tris base, 192mM glicina y 20% de metanol en agua) durante 10 minutos en agitación. La transferencia se realizó en membranas de PVD F (Polyvinylidene difluoride, Milipore) las cuales fueron activadas en metanol durante 2 min, después fueron hidratadas en agua por 2 min y finalmente colocadas en buffer de transferencia.

La transferencia se llevó a cabo utilizando un sistema de cámara semi-húmeda (Bio Rad) con una potencia de 15 voltios y 300 mA durante 30 minutos. Al terminar, la membrana se bloqueó durante 3 horas utilizando leche al 5% en TBS-Tween 1X (tris borato salino 1X (Sigma) + 0.1% de detergente Tween). Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se colocaron los anticuerpos primarios en las concentraciones que se indican en la tabla 3 y se incubaron a 4°C durante toda la noche.

Tabla 3. Características de los anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.

Nombre	# Catálogo	Concentración utilizada [ $\mu$ l de Ac.: $\mu$ l de leche]	Ac. Secundario necesario	Tipo de marcador
<b>E-cadherina (24E10)</b>	#3195	[1:2000]	Anti-Conejo	Epitelial
<b>N-cadherina [5D5]</b>	Ab98952	[1:1000]	Anti-Ratón	Mesénquimal
<b>Vimentina (D21H3)</b>	#5741	[1:1000]	Anti-Conejo	Mesénquimal
<b>Fibronectina</b>	Ab2413	[1:1000]	Anti-Conejo	Mesénquimal
<b>Twist</b>		[1:1000]	Anti-Conejo	Mesénquimal
<b>Tubulina</b>	Sc-53643	[1:2000]	Anti-Ratón	Proteína control de carga

Posteriormente a la incubación del anticuerpo primario, la membrana fue lavada con TBS-Tween 1X de 4-6 veces durante 10 min en agitación. El Anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) se colocó a una concentración [1:2000 en TBS-Tween con 5% de leche] para todas las proteínas. El anticuerpo secundario fue incubado a temperatura ambiente por una hora en movimiento.

Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, la membrana se lavó nuevamente de 4 a 6 veces con TBS-Tween 1X. La expresión proteica fue revelada utilizando un Kit de Quimioluminiscencia (Immobilon Millipore, USA). La quimioluminiscencia fue capturada mediante un transiluminador (Versadoc) con cámara integrada (Kodak) y el programa Quantity One versión 4.6.6 (Bio Rad).

El análisis estadístico para PCR y Western Blot se desarrolló empleando pruebas de T para muestras pareadas de parámetros independientes en Graphpad Versión 5.0.



## *Inmunofluorescencia*

**Nota:** Todos los lavados se realizaron con PBS estéril filtrado previamente, y bajo las condiciones de movimiento oscilatorio y temperatura ambiente.

Las células fueron sembradas sobre cubre-objetos estériles en placas de 6 pozos y fueron incubadas durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos en movimiento y a temperatura ambiente.

Pasados los 20 minutos, las células se lavaron tres veces en PBS y se permeabilizaron con 0.5% de tritón en PBS durante 20 minutos. Inmediatamente, las células se lavaron tres veces y se bloquearon con albúmina al 5% en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente y en movimiento.

Posteriormente, las células se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios diluidos en BSA-5% en las concentraciones marcadas en la tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para Inmunofluorescencias.

<b>Nombre</b>	<b># Catálogo</b>	<b>Concentración utilizada [µl de Ac.: µl de Albúmina]</b>	<b>Ac. Secundario</b>
<b>E-cadherina</b>	#3195 Cell Signaling	[1:200]	Anti-Conejo
<b>N-cadherina</b>	ab98952 Abcam	[1:100]	Anti-Ratón
<b>Vimentina</b>	#5741 Cell Signaling	[1:100]	Anti-Conejo
<b>Fibronectina</b>	ab2413 Abcam	[1:100]	Anti-Conejo

Después de 24 horas de incubación, se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno y se colocaron los anticuerpos secundarios necesarios, los cuales se encuentran unidos al fluorocromo CY3 (rojo).

Todos los anticuerpos secundarios se prepararon a una dilución de 1:200 en 200µl de PBS-Albúmina y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Por último, se realizaron 5 lavado más y las laminillas fueron montadas con DAPI con medio de montaje incluido (Biotium). La captura de imágenes se llevó a cabo en microscopía de Epifluorescencia utilizando el programa Zen Zeiss.

## Migración

Se estandarizó la técnica de cámara Boyden (Corning, #3422 USA) para las células MCF-7. Para ello, se probaron diferentes cantidades de células, concentraciones de SFB, así como el tiempo necesario para observar la migración (Tabla 5).

Los insertos fueron hidratados e incubados con medio de cultivo sin SFB una hora antes del cultivo celular. Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en el mismo medio carente de SFB realizando diluciones para colocar 20 000, 30 000, 50 000 y 70 000 células en 300µl. Las células fueron cultivadas en el interior del inserto, el cual se encontraba suspendido en un pozo con 500µl de medio con SFB.

Tabla 5. Condiciones para la estandarización de la técnica de migración celular.

<b>% SFB en medio quimio-atrayente</b>	<b>20000 células</b>	<b>30000 células</b>	<b>50000 células</b>	<b>70000 células</b>
<b>5</b>	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas
	72 horas	72 horas	72 horas	72 horas
<b>10</b>	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas
	72 horas	72 horas	72 horas	72 horas

Se determinaron las siguientes condiciones: 30,000 células con una concentración quimio-atrayente del 5% SFB y 24 horas. Los insertos fueron enjuagados con PBS y se agregó PFA (4%) durante 20 minutos para fijar las células en ambos lados de la membrana.

Una vez fijadas las células, se tiñeron con Cristal violeta al 0.1% durante 30 minutos. Se realizaron de 5 a 7 lavados para retirar el colorante excedente, y las células que se encontraban en el interior del inserto (células no migratorias) se rasparon, el raspado se realizó con un hisopo evitando doblar o romper la membrana. Se utilizó microscopía estereoscópica para observar y capturar el área completa de la membrana del inserto con las células migratorias teñidas en su cara externa. La cuantificación de células se realizó utilizando el programa ImageJ a partir de las imágenes obtenidas.

## *Invasión*

Para la técnica de invasión, se utilizaron cámaras con matrigel (Corning, #354480, USA), las cuales fueron hidratadas con medio de cultivo sin suero dos horas antes del cultivo celular y colocadas en incubación. Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo sin SFB, se cuantificaron y realizaron diluciones necesarias para colocar 200,000 células en 400µl del medio de cultivo carente de SFB.

Las cámaras con las células incubadas se colocaron en pozos con 700µl de medio de cultivo al 5% de SFB. Posterior a 48 horas las células fueron fijadas, teñidas, observadas y cuantificadas de la misma manera que en el ensayo de migración.

## *Ensayo de degradación de gelatina fluorescente*

Para evaluar la capacidad de degradación, las células NIK+ y Lac se incubaron durante 10 horas en gelatina conjugada con FITC (Invitrogen, Molecular Probes) y fueron teñidas con F-actina siguiendo la técnica descrita por Sakurai y colaboradores en 2008 (Sakurai-Yageta *et al.* 2008). Se utilizaron cubreobjetos circulares de 18 mm, los cuales fueron tratados con Poli-Lisina durante 20 minutos, fijados con glutaraldehído y finalmente recubiertos con 80µl de gelatina fluorescente con borohidrato de sodio y PBS 1X.

Aproximadamente, 70,000 células se sembraron en cada cubreobjetos y se incubaron con medio EMEM suplementado al 10% de SFB. Al finalizar el tiempo de incubación las células se pre-extrajeron con 4% de paraformaldehído (PFA) y 0.3% tritón durante 1.5 minutos. Posteriormente, se *quencharon* con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl por 10 minutos y finalmente se tiñeron con AlexaFluor-faloidina (Invitrogen, Molecular Probes, No. A12380).

Las células se capturaron con objetivos de 40X y 100X de un Imager Axio (Zeiss). El área total de gelatina degradada en un campo (píxeles negros), se midió usando el comando Threshold de ImageJ 1.42q. Para definir el índice de degradación, el área total degradada fue dividida por el número total de células teñidas con faloidina. Por cada cubreobjetos se contaron un total de cien células o más. El índice de degradación de las células control se estableció en 1. Para el análisis estadístico se empleó Prisma Stat.

# VII. Resultados

Para la generación de líneas estables se determinó la concentración mínima a la cual la puromicina y la geneticina provocan muerte masiva en 7 días. Las células MCF-7 sin transfectar presentaron una sensibilidad a puromicina a partir de los 700ng/ml y a geneticina a partir de los 500mg/ml (figura 8).

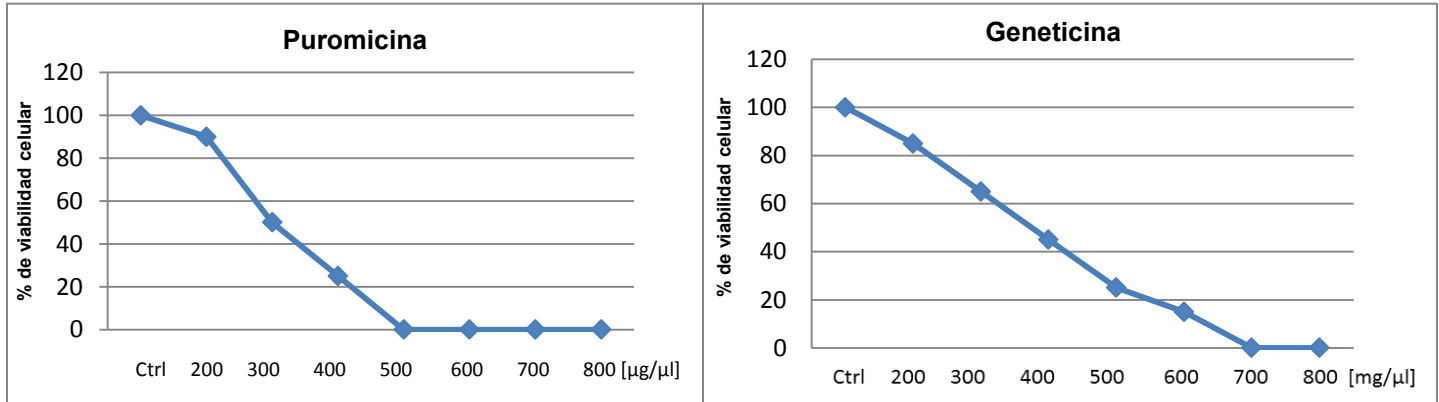


Figura 8. Curva de selección de la concentración mínima necesaria de antibiótico para provocar la muerte de todas las células MCF-7 ATCC sin transfectar. Se determinó utilizar 500 mg/ml de Puromicina para seleccionar células transfectadas con los ShRNAs y 750 µl/ml de Geneticina para las células transfectadas con los vectores de expresión.

Las células transfectadas se seleccionaron con el antibiótico correspondiente durante 4 semanas. Posteriormente se confirmó el incremento y/o disminución en la expresión de NIK por medio de PCR semicuantitativa. La expresión del gen constitutivo GAPDH fue determinada para normalizar los datos. Los resultados muestran que las líneas estables generadas con el shRNA de NIK expresan niveles más bajos de NIK, mientras que las líneas transfectadas con el vector que contiene el ORF de NIK expresan incremento en los niveles de NIK (Figura 9).

Para determinar si NIK participa en la inducción de la TEM, se analizó la expresión de un marcador de células epiteliales (E-cadherina) y un marcador mesénquimal (vimentina). La expresión forzada de NIK resulta en un incremento de 1.59 veces en la expresión de vimentina y una disminución de 0.39 de E-cadherina. Por el contrario, la inhibición de NIK resulta en disminución de la expresión de vimentina de 0.61 y un aumento en la tasa de cambio de E-cadherina del 1.33 (figura 10).

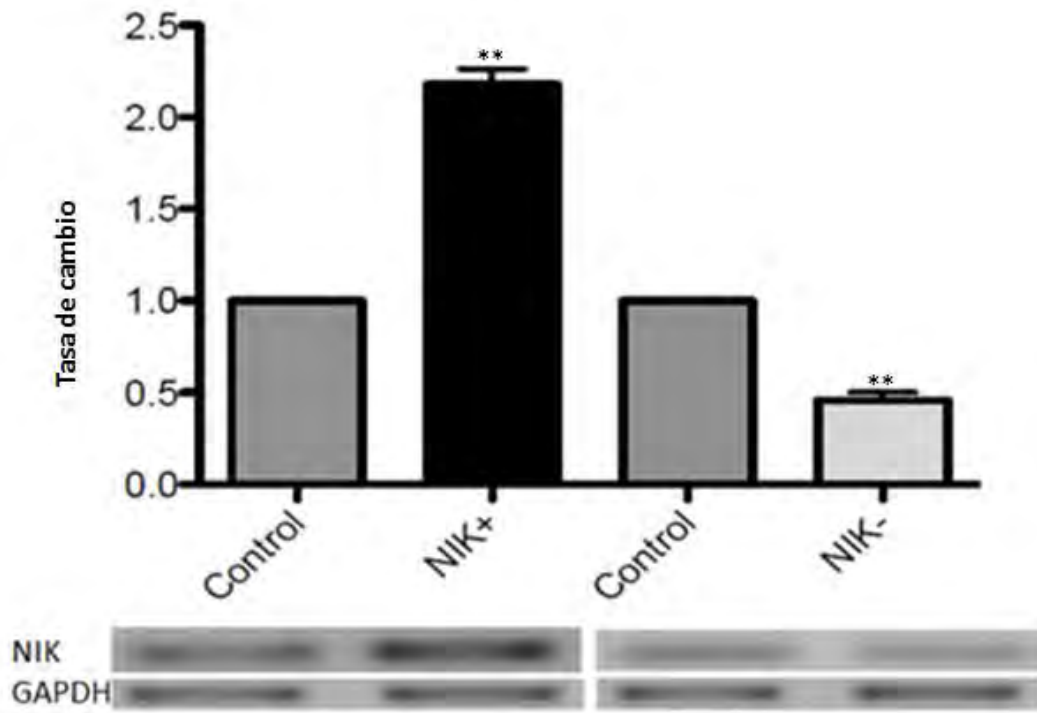


Figura 9. Análisis de la expresión de NIK mediante RT-PCR. La gráfica muestra la tasa de cambio en la expresión del mRNA de NIK en las células estables que sobreexpresan NIK (NIK+), y las células que tienen NIK inhibido (NIK-). La expresión de NIK en las células estables se comparó con los controles correspondientes (Lac y luciferasa). La expresión de GAPDH se utilizó para normalizar los datos. Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras de error representan la desviación estándar y \*\* indican una  $p < 0.05$ .

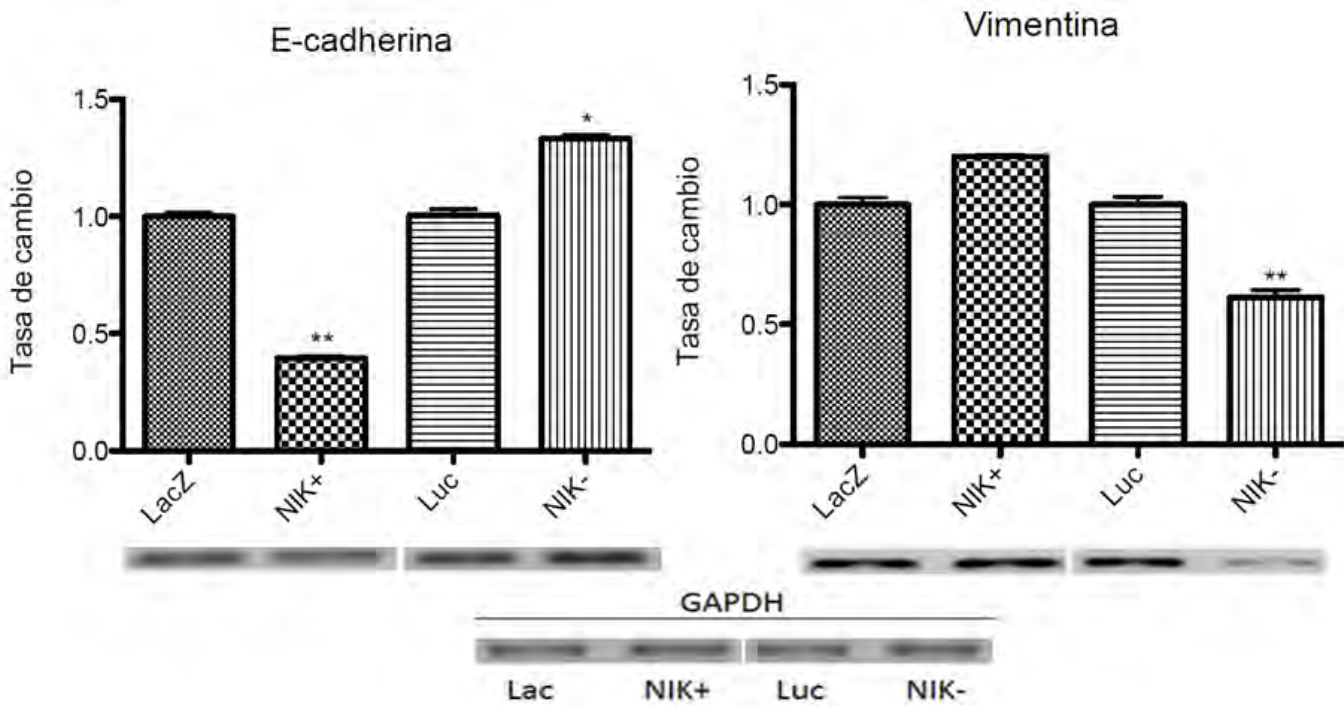


Figura 10. Tasa de cambio en la expresión de vimentina y E-cadherina en las células estables que sobreexpresan o inhiben NIK. Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras de error representan la desviación estándar y \*\* indican una  $p < 0.05$ .

Posteriormente con el fin de determinar si NIK modula la expresión proteica de los marcadores de TEM, se realizó Western Blot. Los resultados permanecieron consistentes con lo obtenido a nivel de mensajero sobre la expresión de E-cadherina. Sin embargo, la expresión proteica de vimentina y snail en la línea celular control y NIK- fue insuficiente para poder realizar una comparación valorable.

Se sabe que durante la TEM se genera un cambio en la expresión de E-cadherina por N-cadherina. Por lo que se decidió evaluar la expresión proteica de N-cadherina para determinar si el cambio de cadherinas reportado por Kuphal y Basserhoff (2006) estaba generándose en nuestro modelo. Los grupos celulares presentan una correlación entre la expresión de NIK y el cambio en la expresión de cadherinas, observando que las células con incremento de NIK (NIK+) presentan altos niveles de la cadherina mesénquimal (N-cadherina) y disminución en la expresión de E-cadherina a diferencia de las células NIK-, las cuales incrementan la expresión de E-cadherina y disminuyen los niveles de N-cadherina.

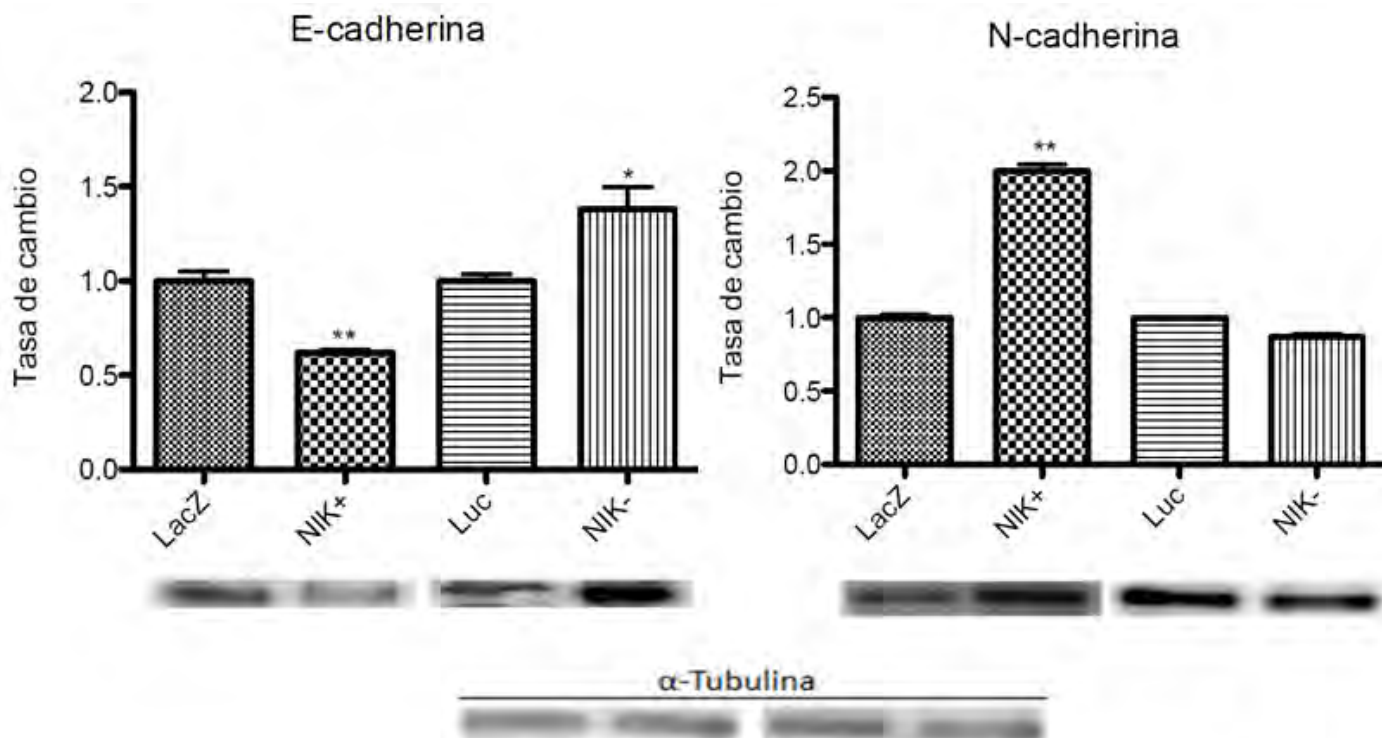


Figura 11. Se observa una disminución en la expresión de la cadherina- tipo epitelial (E-cadherina) en las células MCF-7, así como el incremento en la cadherina mesénquimal (N-cadherina). Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras de error representan la desviación estándar y \* indica un  $p < 0.05$ .

Con el fin de evaluar la influencia de NIK sobre la expresión de factores transcripcionales, se cuantificaron la expresión del mensajero de snail, y la expresión proteica de twist. Se obtuvo que el incremento en los niveles celulares de NIK provoca una tendencia sobre la inducción de la expresión de snail y twist, así mismo, con la deficiencia de NIK tienden a disminuir su expresión (Figura 12 y 13).

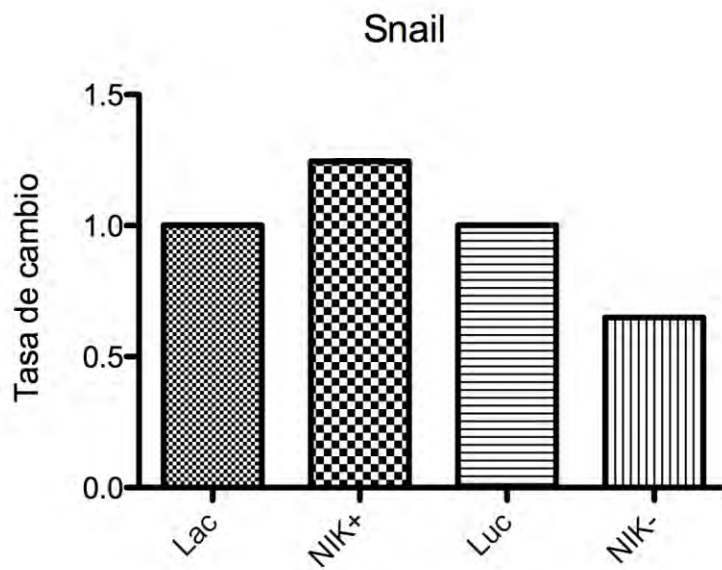


Figura 1. Se observa una tendencia en la tasa de cambio de la expresión de Snail en células que sobreexpresan o inhiben NIK característico de células en TEM. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

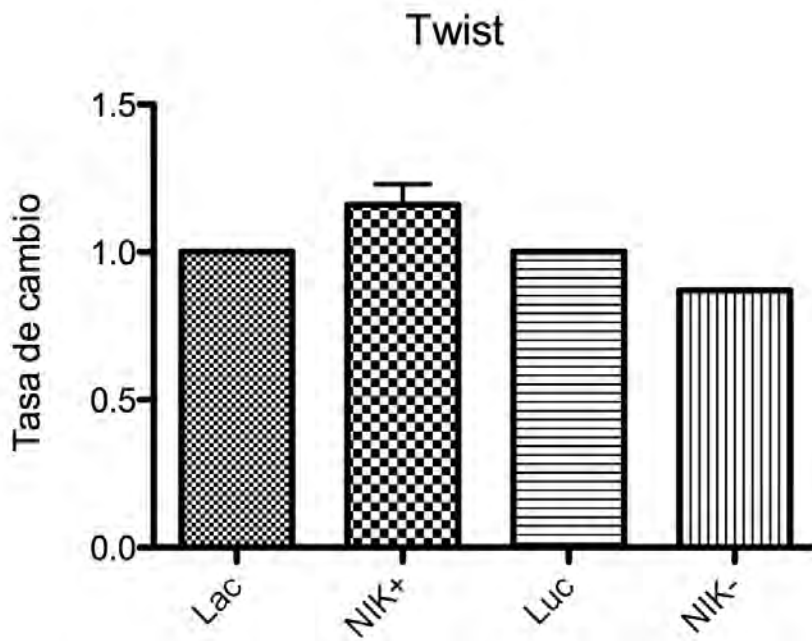


Figura 13. La gráfica muestra la tasa de cambio en la expresión de twist en cada grupo celular. La expresión de twist tiende a incrementar en las células NIK+. Los experimentos fueron realizados por duplicado.



El análisis de las inmunofluorescencias realizadas para E-cadherina, fibronectina y N-cadherina demuestra que las células NIK+ expresan niveles más bajos de E-cadherina y niveles más altos de fibronectina, presentando un fenotipo mesénquimal. Por el contrario, las células NIK-, expresan niveles más altos de E-cadherina y poseen un fenotipo más epitelial. Con respecto a la expresión de N-cadherina no se observaron cambios significativos en los distintos grupos celulares (Figura 14).

La línea celular MCF-7 es una línea epitelial caracterizada por la formación de cúmulos celulares. Sin embargo, el grupo celular NIK+ presentó un cambio morfológico donde el incremento en la expresión de NIK favoreció el origen de una morfología mesénquimal caracterizado por células alargadas (figura 15).

Estos resultados apoyan la idea de que la sobreexpresión de NIK no sólo actúa sobre moléculas involucradas en la TEM, sino que las células están cambiando hacia una morfología tipo mesénquimal.

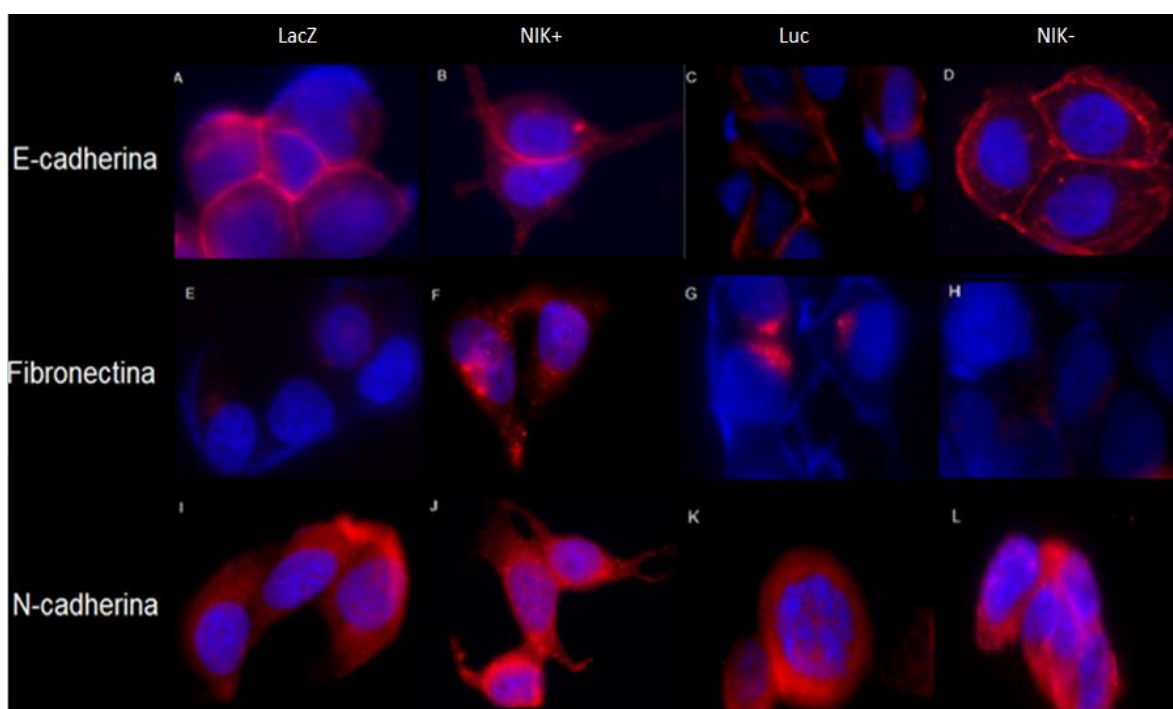
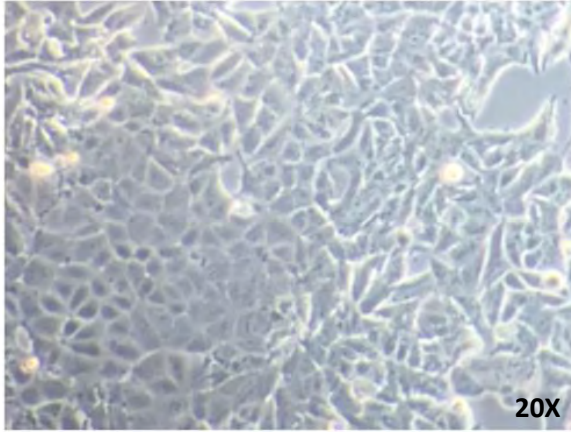


Figura 14. Análisis de la expresión y localización de marcadores moleculares de TEM mediante técnicas de inmunofluorescencia. Las células MCF-7 de los grupos celulares estables fueron marcadas con anticuerpos específicos para E-cadherina, fibronectina y N-cadherina y observadas a 40X. Se utilizó un anticuerpo secundario unido a CY3 (rojo) para determinar la presencia y localización de las proteínas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) (n=3).

**LacZ**



**NIK+**

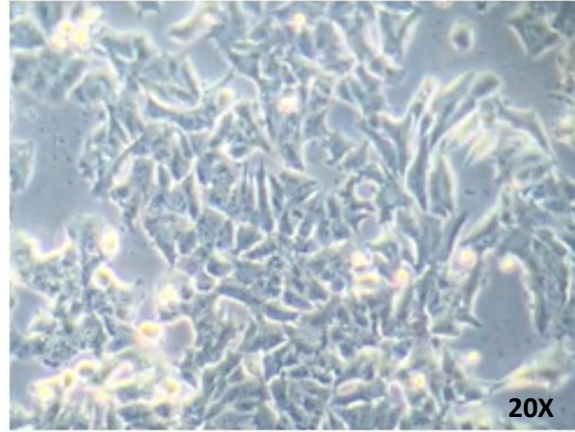


Figura 15. Diferencias morfológicas en células MCF-7 NIK+. En la imagen se puede observar que el grupo celular Nik+ presentó una morfología tipo mesénquimal (alargada y disgregada), a diferencia de las características morfológicas epiteliales del grupo celular control.

Para determinar si la expresión de NIK promueve la migración e invasión de las células MCF-7 se realizaron pruebas utilizando cámaras de Boyden y matrigel respectivamente. Las células NIK+ tienen una mayor capacidad de invasión y migración (figura 16). A su vez, la disminución en la expresión de NIK bloquea la movilidad celular (figura 17).

Por último, se determinó la capacidad de las células NIK+ para degradar componentes de la matriz extracelular. Los resultados muestran que las células NIK+ incrementan 5 veces su capacidad de invasión a través de la degradación de matriz (Figura 18).

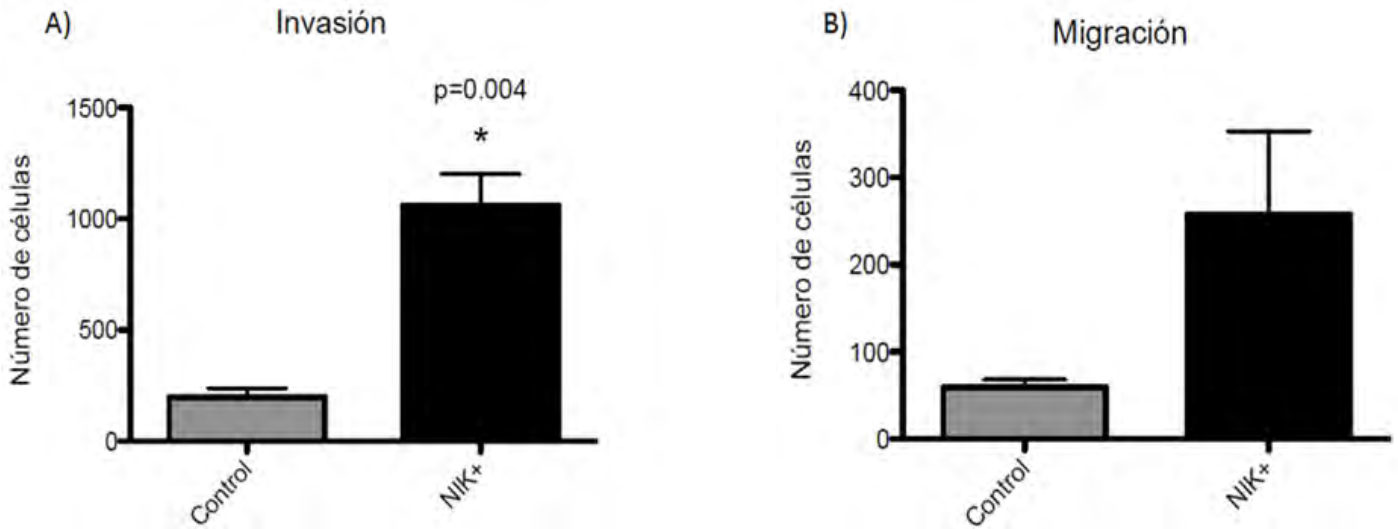


Figura 16. En la imagen A (izquierda) se muestra el análisis de invasión celular realizado en cámaras con matrigel por 48 horas; y en la imagen B (derecha) se presentan las células capaces de migrar a través de una membrana de policarbonato después de 24 horas.

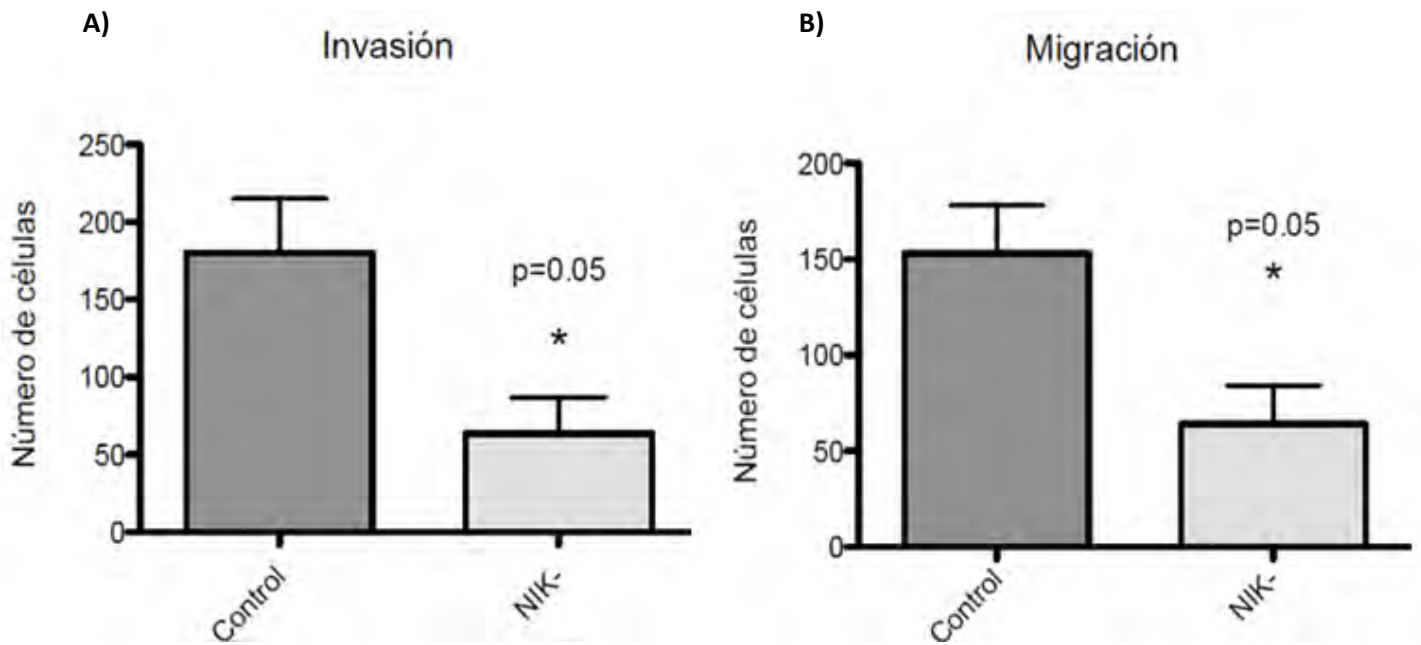


Figura 17. Las gráficas muestran el número de células capaces de migrar o invadir. La disminución en la expresión de NIK genera que un número limitado de células se muevan a través del matrigel (A) y la membrana de policarbonato (B). Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras de error representan la desviación estándar y \* indica una  $p < 0.05$ .

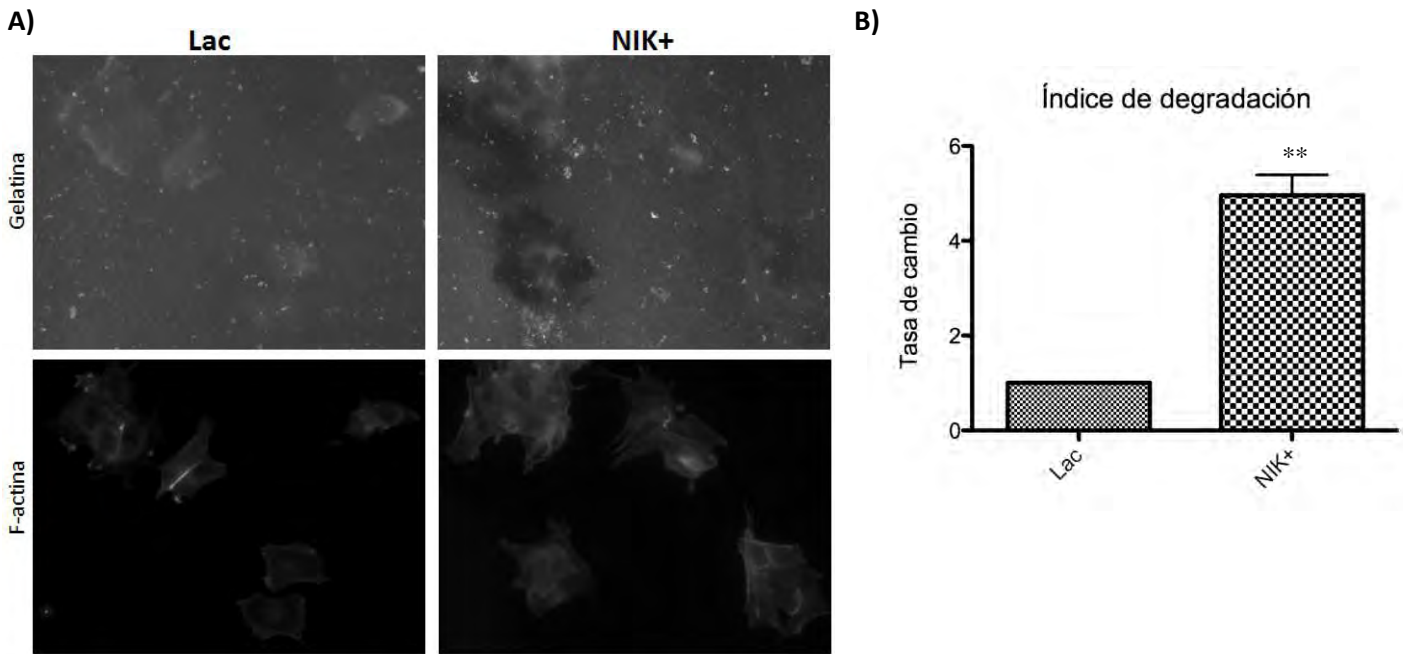


Figura 18. Análisis de degradación de gelatina en células MCF-7 Lac y NIK+.A) Las células fueron sembradas sobre una matriz de gelatina fluorescente (panel superior). Después de 10 horas, las células se fijaron y se tiñeron para F-actina (panel inferior). Los espacios negros se colocan con las células indicando el lugar donde la gelatina fue degradada.

B) La gráfica muestra que la sobreexpresión de NIK incrementa la capacidad de las células para degradar los componentes de la gelatina. Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras de error representan la desviación estándar y \* indica una  $p < 0.05$ .

## VIII. Discusión

---

La metástasis es el principal factor determinante en la mortalidad de pacientes con cáncer de mama. La etapa inicial de metástasis está determinada por células con capacidad de invadir tejidos adyacentes y desplazarse a sitios distales del cuerpo para la formación de un tumor secundario. El cáncer de mama más común en la población mexicana es originado en células epiteliales (carcinomas). El tejido epitelial se caracteriza por células que presentan fuertes uniones intercelulares, sin embargo, se considera que las células neoplásicas desarrollan una pérdida de uniones adherentes y adquieren capacidades invasivas, a esto se le conoce como transición epitelio-mesénquima.

El principal activador de la TEM reportado es TGF- $\beta$ , sin embargo, se ha demostrado que existen varias moléculas características del proceso. Entre las principales proteínas reportadas como marcadores de la TEM se encuentran E-cadherina, vimentina, fibronectina, N-cadherina y los factores de transcripción twist y snail, siendo éste último el principal elemento relacionado con la represión del promotor de E-cadherina.

La vía canónica de NF- $\kappa$ B ha sido relacionada con la inducción y mantenimiento de la TEM, se conoce que la represión de los inhibidores de la vía conduce a la adquisición de un fenotipo mesénquimal. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel que la vía no canónica de NF- $\kappa$ B puede tener sobre la transición.

NIK es la cinasa responsable de la activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B y se ha observado que se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama tipo basal, el cual posee la peor prognosis para el paciente debido a la alta capacidad de metástasis y resistencia a fármacos que presenta. De igual manera, se ha observado que la sobreexpresión de NIK se encuentra relacionada con la ganancia de un fenotipo de células troncales de cáncer en un modelo *in vitro* de carcinoma mamario utilizando las células MCF-7 (Yamamoto *et al.* 2013).

Existen estudios que demuestran la relación estrecha entre el proceso de transición epitelio-mesénquimal y la ganancia de un fenotipo tipo troncal en las células neoplásicas (Santisteban *et al.* 2009; May *et al.* 2011; Morel *et al.* 2008). Es por eso que el presente trabajo pretendió evaluar si NIK podría ser un regulador de la activación de la transición epitelio-mesénquimal. Para ello, se transfectaron y seleccionaron células estables de la línea MCF-7 con el fin de incrementar e inhibir la expresión de la cinasa.

Los resultados muestran que la expresión de los marcadores mesenquimales: vimentina, N-cadherina y fibronectina mantienen una relación directa con la expresión de NIK. Por otro lado, la expresión de E-cadherina se favorece cuando NIK es inhibido.

La disminución en la expresión de E-cadherina se encuentra relacionada con la tendencia en el incremento de expresión de Snail, coincidiendo con lo reportado por Bolos y colaboradores (2003), quienes mencionan que snail reprime la expresión de E-cadherina. Lo cual fue posteriormente explicado por Kalluri y Weinberg (2009), quienes afirman que la represión de E-cadherina está basada en la acción directa de snail sobre el promotor de CDH1. A su vez, vimentina es una proteína que favorece la movilidad celular y se encuentra principalmente sobreexpresada en fibroblastos y células mesenquimales.

Se ha demostrado que E-cadherina es un factor clave para la inducción de transición epitelio-mesénquimal debido a que a partir de su represión se desencadenan reacciones que favorecen la expresión de un fenotipo mesénquimal. Kuphal y Bosserhof (2006) mencionan que E-cadherina provoca un cambio en la expresión de N-cadherina regulado directamente por twist. Sin embargo, nuestros resultados colocan a NIK como posible intermediario en la activación de twist, lo cual incrementa la expresión de N-cadherina y esto a su vez reprime la expresión de E-cadherina.

La transición epitelio-mesénquimal está caracterizada por la capacidad invasiva que poseen las células inmersas. Nuestro estudio indica que la sobreexpresión de NIK favorece el desplazamiento celular, lo cual se encuentra relacionado con el incremento en la expresión de vimentina, fibronectina y la tendencia de incremento de Snail, debido a que estas proteínas en conjunto tienen la capacidad de reprimir la expresión de uniones adherentes (E-cadherina), incrementar la movilidad celular por generación de filamentos intermedios y se ven relacionadas con incrementos en la expresión de metaloproteinasas de membrana MMP-2 y MMP-9 (Wang, 2006), las cuales facilitan a las células a degradar la matriz extracelular.

Las células NIK+ no sólo presentaron incremento en la expresión de marcadores de TEM, sino que la inhibición de este produjo un incremento en la expresión de E-cadherina, permitiéndonos inferir el papel que tiene no sólo sobre la inducción de la TEM, sino como un importante sustentador del fenotipo epitelial.

# IX. Conclusiones

---

- La sobreexpresión de NIK incrementa la expresión de los marcadores mesénquimales vimentina, N-cadherina, fibronectina y disminuye la expresión del marcador epitelial E-cadherina en células MCF-7.
- En el modelo *in vitro*, NIK se relaciona directamente con una tendencia en los niveles de los factores de transcripción snail y twist.
- La disminución de los niveles de NIK favorece el mantenimiento del fenotipo epitelial en células de carcinoma mamario.
- Las capacidades de migrar e invadir se incrementan cuando NIK se encuentra sobreexpresado, por otro lado, la disminución de NIK bloquea estas capacidades.



# X. Referencias

---

- Ámate Tócate. (2014). Estadios clínicos o etapas clínicas parte 2. 22-04-2016, de Ámate Tócate Sitio web: <http://www.amatetocate.com.co/home/estadios-clinicos-o-etapas-clinicas-parte-2/>.
- American Cancer Society. (2016). What is Cancer?. 23-04-2016, de American Cancer Society Sitio web: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>.
- Andela, V.B. Schwarz, E.M., Puzas, E. O'Keefe, R.J., Rosier, R.N. (2000). Tumor Metastasis and the Reciprocal Regulation of Prometastatic and Antimetastatic Factors by Nuclear Factor  $\kappa$  B Advances in Brief Tumor Metastasis and the Reciprocal Regulation of Prometastatic and Antimetastatic Factors by Nuclear Factor B. *Cancer Res*, (60), pp.6557–6562. PMID: 11118032
- Bolos, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., Cano, A., (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transition: a comparison with snail and E4 repressors. *Journal Cell Sci*. 116: 499-511. PMID: 12508111
- Bonnomet, A., (2010). Epithelial-to-Mesenchymal Transitions and Circulating Tumor Cells J Mammary Gland. *Biol Neoplasia*. 15:261–273. doi: 10.1007/s10911-010-9174-0.
- Carey, L. Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Moorman, M.G., (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 295(21), pp.2492–2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C., (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer*, 2(8), pp.563–572. doi: 10.1038/nrc865.
- Chua, H.L. et al., 2007. NF- $\kappa$ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, 26(5), pp.711–724. doi: 10.1038/sj.onc.1209808.
- deGraffenried, L. A., Chandrasekar B., Friedrichs W.E., Donzis E., Silva J., Hidalgo M., Freeman J.W., Weiss G.R., (2004). NF- $\kappa$ B inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen. *Annals of Oncology*, 15(6), pp.885–890. PMID: 15151944.
- Delhalle, S., Blasius R., Dicato M., Diederich M., (2004). A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030, pp.1–13. PMID: 15659775.
- Fan, C., Oh D.S., Wessels L., Weigelt B., Nuyten D.S., Nobel A.B., van't Veer L.J., Perou C.M., (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *The New England journal of medicine*, 355(6), pp.560–569. PMID: 16899776.
- Gerondakis, Grumont R., Gugasyan R., Wong L., Isomura I., Ho W., Banerjee A., (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, 25(51), pp.6781–6799. PMID: 17072328
- Gilmore, T.D., (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), pp.6680–6684.
- Gye, Y.P. , Wang X., Hu N., Pedchenko T.V., Blackwell T.S., Christman J.W., (2006). NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKK $\alpha$  *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), pp.18684–18690. PMID: 16675465
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A., (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hoesel, B. & Schmid, J. A., (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*, 12(1), p.86. doi: 10.1186/1476-4598-12-86.

- Hoffmann, a, Natoli, G. & Ghosh, G., (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 25(51): 6706–6716. doi:10.1038/sj.onc.1209933.
- Huang, S., Pettaway C.A., Uehara H., Bucana C.D., Fidler I.J., (2001). Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*, 20(31), pp.4188–4197. PMID: 11464285.
- Huber, M., Azoitei N., Baumann B., Grünert S., Sommer A., Pehamberger H., Kraut N., Beug H., Wirth T.I., (2004). NF-  $\kappa$  B is essential for epithelial- mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), pp.569–581. PMID: 15314694.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A., (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1420–1428. doi:10.1172/JCI39104.
- Kim, D.W., Romieu-Mourez, R., Shin, S.M., Demicco, E.G., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., Cardii, R.D., Sonenshein, G.E., (2003). Mouse Mammary Tumor Virus c-rel Transgenic Mice Develop Mammary Tumors. *Society*, 23(16), pp.5738–5754. doi: 10.1128/MCB.23.16.5738-5754.2003
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., Wajant, H., (2001). NF- $\kappa$ B Inducers Upregulate cFLIP , a Cycloheximide-Sensitive Inhibitor of Death Receptor Signaling NF- $\kappa$ B. *Molecular and Cellular Biology*. 21(12), pp.3964–3973. doi: 10.1128/MCB.21.12.3964-3973.2001.
- Kuphal, S. & Bosserhoff, a K., (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene*, 25(2), pp.248–259. PMID: 16132038.
- May, C.D., Sphyris N., Evans K.W., Werden S.J., Guo W., Mani S.A., (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. , 13(1), p.202. doi: 10.1186/bcr2789.
- Morel, A.-P., Lièvre, P., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*, 3(8), p.e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888
- Nakshatri, H., bhat-nakshatri, P., Martin, D., Goulet, J., Sledge, G.W., (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Molecular and cellular biology*, 17(7), pp.3629–3639. PMID: 9199297.
- Napetschnig, J. & Wu, H., (2013). Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annual review of biophysics*, 42(March), pp.443–68. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130338.
- Orlowski, R.Z. & Baldwin, A.S., (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends in molecular medicine*, 8(8), pp.385–389. PMID: 12127724.
- Qing, G. & Xiao, G., (2005). Essential role of IkappaB kinase alpha in the constitutive processing of NF-kappaB2 p100. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), pp.9765–9768. PMID: 15677466.
- Ramakrishnan, P., Wang, W. & Wallach, D., (2004). Receptor-Specific Signaling for Both the Alternative and the Canonical NF- $\kappa$ B Activation Pathways by NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase. *Immunity*, 21(4), pp.477–89. PMID: 15485626
- Rouzier, R., Charles, M., Perou, W., Symmans, F., Nuhad I., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess K.R., James S., Ayers, M., Wagner, P., Morandi P., Fan, C., Rabiou, I., Ross, J.R., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11(16), pp.5678–5685. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2421.
- Sahai, E., (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics & development*, 15(1), pp.87–96. doi:10.1016/j.gde.2004.12.002.
- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., Chavrier, P., (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell

- invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *Journal of Cell Biology*, 181(6), pp.985–998. doi: 10.1083/jcb.200709076.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J.F., Kaufmann, M., Diebold, M., Arnholdt, H., Müller, P., Bischoff, J., Harich, D., Schlimok, G., Riethmüller, G., Eils, R., and Klein C.A., (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), pp.7737–7742. doi: 10.1073/pnas.1331931100.
- Shook, D. & Keller, R., (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development*, 120(11), pp.1351–1383. doi:10.1016/j.mod.2003.06.005.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron J.S., Nobel, A., Deng S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E. Brown, P.O., Børresen-Dale, A.L., Botstein, D., (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), pp.8418–8423. PMID: 12829800.
- Sullivan, J.C., Kalaitzidis, D., Gilmore, T.D., Finnerty J.R., (2007). Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development Genes and Evolution*, 217(1), pp.63–72. PMID: 17120026.
- Sun, Z., & Andersson, R., (2002). NF- $\kappa$ B activation and inhibition: a review. *Shock*, 18(2), pp.99–106. PMID: 12166787
- Thiery, J.P., Aclouque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), pp.871–890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Thu, Y.M. & Richmond, A., (2012). NF- $\kappa$ B inducing Kinase: A key regulator in the immune system and in cancer. *Oncogene*. 29(6), pp.997–1003. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.06.002.
- Van Zijl, F., Krupitza, G., Mikulits, W., (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(1-2), pp.23–34. doi:10.1016/j.mrrev.2011.05.002.
- Viennois, E., Chen, F., Merlin, D., (2013). NF- $\kappa$ B pathway in colitis-associated cancers. *Translational gastrointestinal cancer*, 2(1), pp.21–29. doi:10.3978/j.issn.2224-4778.2012.11.01.
- Wang, L., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Gregg, S.R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., Wang, Y., Chopp M., (2006). Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Secreted by Erythropoietin-Activated Endothelial Cells Promote Neural Progenitor Cell Migration. *JNeurosci*. 26(22): 5996-6003. doi:10.1523/JNEUROSCI.5380-05.2006
- Wei, L., Liu, T.T., Wang, H.H., Hong, H.M., Yu, A.L., Feng, H.P., Chang, W.W., (2011). Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor- $\kappa$ B. *Breast Cancer Research*, 13(5), p.R101. doi: 10.1186/bcr3042.
- Xiao, G. & Fu, J., (2011). NF- $\kappa$ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *American journal of cancer research*, 1(2), pp.192–221. PMID: PMC3180046.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., Sun, S.C., (2001). NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100. *Molecular Cell*, 7(2), pp.401–409. doi:10.1016/S1097-2765(01)00187-3.
- Xie F., Li X., Wei C., Liang G., Dang Y., Shan Z., (2015). C/EB $\beta$ PB promotes NF- $\kappa$ B-mediated invasion and migration of human renal carcinoma 786-0 cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 31(11):1483-1487. PMID: 26522356.
- Yamamoto M, Taguchi Y, Ito-Kureha T, Semba K, Yamaguchi N, Inoue J., (2013). NF- $\kappa$ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat Commun* 4, 2299 .

- Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J.Q., Cheng, G., (2008). Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), pp.3503–3508. doi: 10.1073/pnas.0707959105.
- Zeisberg, M. & Neilson, E.G., (2009). Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. , 119(6), pp.1429–1437. doi:10.1172/JCI36183.
- Zepeda-Castilla, E.J., Recinos-Money, E., Cuéllar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C.D., Maafs-Molina, E., (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugia y Cirujanos*, 76(1), pp.87–93. doi:10.4206/cuad.cir.2011.v25n1-10.

# XI. Lista de abreviaturas:

---

**NIK:** Cinasa inducible de NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B inducing kinase)

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear Kappa B (Nuclear factor kappa B)

**ATP:** Adenosín tri-fosfato (Adenosine triphosphate)

**TP53:** Proteína de tumor p53 (Tumor protein 53)

**TGF $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta)

**Her2:** Receptor de factor de crecimiento epidermal humano 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)

**RE:** Receptor de estrógenos

**RP:** Receptor de progesterona

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase)

**MMPs:** metaloproteinasas de matiz extracelulas (Matrix metalloproteinases)

**Zeb 1-2:** Proteína de dedo de Zinc de unión a la caja E de homeobox (Zinc finger E-box binding homeobox)

**SMAD:** Proteínas homólogas de las proteínas madre contra decapentaplégico de Drosophila (Small mothers against decapentaplegic)

**RHD:** Dominio de homología a Rel (Rel-homology domain)

**TSA:** Dominio de transactivación (Transactivation domain)

**NLS:** Señal de localización nuclear (Nuclear localization signal)

**LPS:** Lipopolisacáridos

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

**IKBs:** Proteínas inhibidoras de Kappa-B (Inhibitors of Kappa-B)

**IKKs:** Kinasas de los inhibidores de Kappa-B (IKappa-B Kinases)

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha)

**IL-1 $\beta$ R:** Receptor beta de interleucina 1 (Interleukin 1 receptor beta)

**TLR:** Receptores tipo Toll (Toll-like receptors)