



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

• • •

**EFFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE IKBKE EN EL
TRANSCRIPTOMA DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ZHANNA ORLOVA



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX. 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.

1. Datos del alumno

Orlova
Zhanna
5510118590
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307658948

2. Datos del tutor

M. en C.
Karla Itzel
Vázquez
Santillán

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Marcela
Lizano
Soberón

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Floria Josefina
Lizárraga
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Julio Isael
Pérez
Carreón

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Tania Valentina
López
Pérez

7. Datos del trabajo escrito.

Efectos de la sobreexpresión de IKBKE en el transcriptoma de la línea celular MCF-7
55 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, quiero agradecerle a mi hermosa familia:

Mamá, te quiero agradecer a ti primero. Por amarme más que a nadie en esta vida. Por cuidarme siempre. Por aconsejarme en todo y por ayudarme en todas las cosas. Te amo. Gracias por todo lo que me has dado. No habría llegado hasta aquí si no fuera por ti.

Papá, gracias por todo. Especialmente por esos días en los que me contabas sobre las cosas más raras del universo. Las recuerdo siempre y me han inspirado a dedicarme a la ciencia a como de lugar para resolver al menos algunas piezas del rompecabezas que conforma esto a lo que le llamamos «realidad». Te amo. Hermanita, mi vida sin ti no sería la misma. Gracias por estar para mí en las situaciones más difíciles y echarme la mano en todo. Eres la mejor hermana del mundo.

A las todas las personas del laboratorio de Epigenética del INMeGen. Gracias por esta oportunidad, por ayudarme y guiarme en este proceso. Sobre todo mi tutora, Karlita, gracias por todo. Me has enseñado todo súper bien, aprendí a hacer un buen de cosas y el proyecto quedó súper genial. Te admiro mucho.

A mi queridísima Facultad de Ciencias. A los buenos amigos que hice. A las mejores experiencias de mi vida. Gracias, Diana, tú eres una de ellas. Sobre todo por tu apoyo incondicional y todos los momentos más padres que hemos pasado. Gracias por todo. Bunniness is: reading my thesis.

A mis mejores amigos. Gracias por apoyarme en todos los aspectos. Karen, gracias por tantos milenios de amistad, por escucharme siempre y por ser tan buena amiga. Lee mi tesis. Eres mi bestest friend, te quiero un buen.

A la vida: ¡gracias por ser y dejarme estudiarte!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
1. Cáncer	2
1.1 Epidemiología del cáncer.....	2
1.2 Principios distintivos del cáncer	2
1.2.1 Proliferación crónica.....	2
1.2.2 Evasión de supresores de crecimiento	3
1.2.3 Evasión de muerte celular programada.....	4
1.2.4 Inducción de angiogénesis.....	5
1.2.5 Activación de la invasión y la metástasis	5
1.2.6 Propiedades emergentes.....	5
2. Cáncer de mama	6
2.1 Epidemiología	6
2.2 Clasificación	6
2.2.1 Clasificación histológica.....	8
2.2.2 Clasificación molecularr	8
2.2.2.1 Subtipo luminal.....	8
2.2.2.2 Subtipo HER-2 positivo	8
2.2.2.3 Subtipos triple negativos	8
2.2.2.4 Subtipo <i>normal-like</i>	8
2.2.3 Subtipos fisiológicos de cáncer mama.....	9
2.3 Heterogeneidad tumoral en cáncer de mama.....	9
2.4 Las células troncales de cáncer de mama.....	10
3. IKBKE	10
3.1 IKKs canónicas	10
3.2 IKKs no canónicas: IKKε y TBK1	10
3.3 IKBKE como oncogén de cáncer de mama.....	10
II JUSTIFICACIÓN	11
III HIPÓTESIS	12
IV OBJETIVOS	12
1. Objetivo general	12
2. Objetivo particular.....	12
V MATERIAL Y METODOS	13
1. Obtención de los plásmidos	13
1.1 Transformación de las bacterias <i>E. Coli</i>	13

1.2 Extracción de los plásmidos	13
2. Cultivo de células MCF-7	13
2.1 Siembra	14
2.2. Transfección transitoria	14
3. Extracción de RNA	14
4. Validación de la sobreexpresión de IKBKE.....	14
4.1 RT	14
4.2 PCR cuantitativa.....	15
5. RNA-seq.....	15
5.1 Control de calidad.....	15
5.2 Secuenciación	15
5.3 Análisis del transcriptoma y selección de genes diferenciales	16
6. IPA.....	16
VI RESULTADOS	16
1. Caracterización de los plásmidos pcDNA3-flag-IKKe y pT-REX/GW-30/LacZ	16
2. Transfección transitoria y sobreexpresión de IKBKE	18
3. Calidad del RNA	21
4. Control de calidad de los resultados de secuenciación	24
5. Expresión diferencial ante la sobreexpresión de IKBKE.....	26
6. La sobreexpresión de IKBKE alteró la expresión de genes involucrados en diversos procesos biológicos .	29
7. La sobreexpresión de IKBKE alteró la expresión de genes involucrados en la carcinogénesis	33
8. IKBKE y el fenotipo troncal en cáncer	37
9. Validación de los datos	38
VII DISCUSIÓN.....	39
1. Activación de <i>hallmarks</i>	39
2. Propiedades troncales	40
VIII CONCLUSIÓN	42
IX PERSPECTIVAS	42
X REFERENCIAS	43

ABREVIATURAS

Akt	Proteína cinasa B
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
CD24	Cluster of differentiation 24 (grupo de diferenciación 24)
CD44	Cluster of differentiation 44 (grupo de diferenciación 44)
CSC	Cancer stem cells (células troncales de cáncer)
CT	Cycle threshold (ciclo umbral)
CTRL	Control
GFP	Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
EDGE	Extraction of differential gene expression (extracción de expresión génica diferencial)
EDTA	Ácido etilendiaminoteraacético
EMT	Transición epitelio mesénquima
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (cinasa regulada por señal extracelular)
FC	Fold change
Hh	Hedgehog
IκB	Inhibidor de kappa-B
IKBKE	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit ϵ (cinasa del inhibidor del factor nuclear kappa-B, subunidad ϵ)
IKKs	Cinasas de I κ B
IL	Interleucina
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRF	Interferon regulatory factor (factor regulador de interferones)
JAK	Janus kinase (cinasa de Janus)
MAPK	Mitogen activated protein kinase (proteína cinasa activada por mitógenos)
mTOR	Mechanistic target of rapamycin (molécula diana de la rapamicina)
NCBI	National center for biotechnology information
NF-κB	Nuclear factor kappa-B (factor nuclear kappa-B)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa

PM	Peso molecular
RIN	Número de integridad del RNA
RNA-seq	Secuenciación de RNA total
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y de transcripción reversa
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TLR	Toll-like receptor (receptor tipo toll)
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TNF	Factor de necrosis tumoral
ΔCT	Cambio en el ciclo umbral

RESUMEN

El cáncer de mama engloba una serie de enfermedades clínica, histológica y molecularmente muy heterogéneas. En los tumores existe una población de células cancerosas con propiedades troncales conocidas como células troncales de cáncer (CSC). La hipótesis de las CSC postula que esta población celular contribuye a la heterogeneidad tumoral en cáncer de mama y en otros tumores. Las células que componen a la neoplasia pueden presentar diferentes grados de heterogeneidad en varios procesos celulares como la expresión génica, proliferación, metabolismo, capacidad metastásica, resistencia a agentes tóxicos y terapéuticos, entre otros. El oncogén IKBKE codifica para la proteína cinasa IKKe, la cual participa en la fosforilación del Inhibidor del factor de transcripción NF- κ B (I κ B) permitiendo la translocación al núcleo de NF- κ B y la transcripción de genes que participan en la proliferación, respuesta inflamatoria, supervivencia y el mantenimiento del fenotipo troncal en cáncer por regular la transcripción por otros factores como STAT3, IRF3 y elementos río abajo de Akt. IKBKE se sobreexpresa en aproximadamente 30% de los tumores mamarios, aunque otros tipos de cáncer también presentan un incremento en su nivel de expresión. En varios estudios se ha demostrado que la cinasa interactúa con diversos elementos de vías de señalización alteradas frecuentemente en cáncer de mama y otros tumores. En este estudio se hipotetizó que la sobreexpresión de IKBKE en un modelo luminal de cáncer de mama podría afectar la expresión de genes relacionados con la tumorigénesis, la progresión tumoral y el fenotipo CSC. Mediante un análisis bioinformático del transcriptoma, se observaron cambios en la expresión de genes involucrados en procesos carcinogénicos y de mantenimiento del fenotipo troncal.

I INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

El cáncer es el nombre universal que se le confiere a un conjunto de más de cien enfermedades [ASC, 2016; OMS, 2016] caracterizadas por la persistente proliferación y crecimiento anormal de las células [Hannahan & Weinberg, 2011; DeVita, et al 2008]. Las células cancerosas están definidas por dos propiedades heredables: su capacidad de dividirse por encima del potencial de las células normales y de invadir otros tejidos [Alberts et al, 2015; OMS, 2016].

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial que se presenta con mayor incidencia en países de bajo desarrollo. En el año 2012 se reportaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer. En ese mismo año se calcularon 8.2 millones de muertes, 7% más que en los registros del 2008 [GLOBOCAN, 2012]. Se estima que la incidencia de nuevos casos de cáncer incrementará un 70% en las siguientes dos décadas [OMS, 2015].

En México el cáncer también representa un problema grave de salud. Los tumores malignos que ocasionaron el mayor número de muertes por cáncer en el 2013 fueron los que afectaron a los órganos digestivos, del sistema respiratorio, sistema reproductor masculino, mama y órganos genitales femeninos [INEGI, 2016]. Estos datos corresponden a una población mayor de 20 años. Cabe señalar que la edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer [NCI, 2016]. Sin embargo, en personas menores a 20 años, los tumores malignos prevalentes se presentan en órganos hematopoyéticos, sistema nervioso central, hueso, cartílago y tejido linfático [INEGI, 2016].

1.2 PRINCIPIOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER

Basándose en la idea de que el cáncer es una enfermedad progresiva, que a lo largo de su desarrollo va adquiriendo ciertas propiedades que lo hacen más agresivo, el grupo de Hannahan y Weinberg (2000) propusieron una serie de características adquiridas (del inglés, *hallmarks*) durante el desarrollo de la neoplasia (Figura 1).

1.2.1 PROLIFERACIÓN CRÓNICA

La característica fundamental del cáncer es, sin duda, la capacidad de sostener una proliferación crónica [Hanahan y Weinberg, 2011]. Esta propiedad se puede alcanzar mediante diferentes mecanismos, todos involucrando alguna falla en las vías de señalización que responden a factores de crecimiento. Estas moléculas interactúan con receptores de la membrana celular y activan redes de señalización asociadas al control de la progresión del ciclo celular [Aronson, 1991].

Se pueden presentar dos mecanismos por los cuales las células cancerosas adquieran esta propiedad. El primero consta de la producción y secreción de factores de crecimiento al espacio pericelular y/o matriz extracelular para responder a ellos de manera autócrina o parácrina, al estimular a las células vecinas para su producción. El segundo mecanismo implica la desregulación de alguno de los elementos que componen a las vías de señalización activadas por factores de crecimiento.

Particularmente, las alteraciones estructurales de receptores membranales pueden volver hiperresponsivas a las células tumorales. Algunas alteraciones promueven la activación independiente de ligando. En este caso el receptor mantiene activada la vía de señalización de manera constitutiva. Alteraciones estructurales en elementos río abajo de la vía de señalización también juegan un papel importante en la activación persistente de la señal.

Otra característica que se puede presentar en los receptores de membrana que responden a factores de crecimiento es la sobreexpresión. El incremento en el número de copias de un gen se puede dar mediante diversos mecanismos, un ejemplo de esto es la amplificación del gen HER-2, presente en un 15-20% de los casos de cáncer de mama. La sobreexpresión de algunos receptores de factores de crecimiento como HER-2 y EGRF está relacionada con un peor pronóstico en varios tipos de cáncer [Ménard et al, 2001].

1.2.2 EVASIÓN DE SUPRESORES DE CRECIMIENTO

Otra característica adquirida durante la formación del tumor (tumorigénesis) es la evasión de los supresores de crecimiento celular. Al evadir la acción de los supresores de crecimiento, la célula puede crecer y dividirse sin restricciones [Hanahan y Weinberg, 2011]. Los supresores de crecimiento regulan negativamente los programas de proliferación para contrarrestar los efectos de una proliferación descontrolada. Este tipo de programas son regulados en su mayoría por genes supresores de tumores. La pérdida de función de estos genes tiene como consecuencia una pérdida en el control en procesos como el crecimiento, la proliferación celular y la muerte celular programada. Un ejemplo de este mecanismo puede ser ilustrado por la pérdida de función del supresor de tumores Rb –proteína que integra señales extra e intracelulares para regular el ciclo de división y proliferación– que contribuye a la iniciación y progresión del cáncer [Burkhart y Sage, 2008].

1.2.3 EVASIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Las células tumorales no sólo pueden evadir el efecto restrictivo de crecimiento por parte de los genes supresores, sino que también las alteraciones en la vía de muerte celular programada (apoptosis), le permiten a las células cancerosas sobrevivir a pesar de los estímulos inductores de apoptosis como: la señalización de oncogenes (p.ej., c-myc), el daño al DNA, el estrés fisiológico ocasionado por factores ambientales, etc. [Hanahan y Weinberg, 2011]. La inactivación de los elementos que controlan la vía de muerte celular programada le confieren a la célula neoplásica un amplio espectro de ventajas para sobrevivir a pesar de su exposición a agentes terapéuticos [Melet et al, 2008]. Por ejemplo, las mutaciones puntuales en el factor de transcripción TP53 impiden su participación en la transcripción de genes proapoptóticos [Wong, 2011]. Otro tipo de factor de transcripción desregulado en el mecanismo de la evasión de la apoptosis es NF-kB. En este caso, este factor se encuentra expresado de manera activa, participando en la transcripción de genes antiapoptóticos como: IAP-1, IAP-2, XIAP, IEX-1L, TRAF-1 y TRAF-2 [Weinberg, 2007].

1.2.4 INDUCCIÓN DE ANGIOGÉNESIS

Al ir incrementando de tamaño, el tumor se ve desconectado del sistema circulatorio lo cuál puede originar sitios de hipoxia [Hanahan y Weinberg, 2011]. Ante la necesidad de oxígeno y nutrientes, el tumor es capaz de secretar factores que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya preexistentes en un proceso denominado angiogénesis [DeVita et al, 2008]. El *switch* angiogénico se compone de factores conocidos como «reguladores angiogénicos» que pueden activar o inhibir la formación de vasos sanguíneos y estimular o inhibir la angiogénesis. Este tipo de proteínas se pueden unir a receptores de membrana en células endoteliales e inducir la angiogénesis. Uno de los inductores de la angiogénesis es el factor VEGF-A y otros, como TSP-1 que pueden estimular el efecto contrario [Bergers y Benjamin, 2003; Weinberg, 2007].

La vasculatura del tumor se dispone de manera irregular a causa de una señalización incongruente de reguladores tanto positivos como negativos de la angiogénesis. Se considera que los vasos sanguíneos presentes en el tumor o alrededor de él, se encuentran distorsionados, con flujo sanguíneo errático y las paredes de los vasos presentan fugas que aportan a la permeabilidad de los vasos sanguíneos ocasionando microhemorragias frecuentes [DeVita et al, 2008].

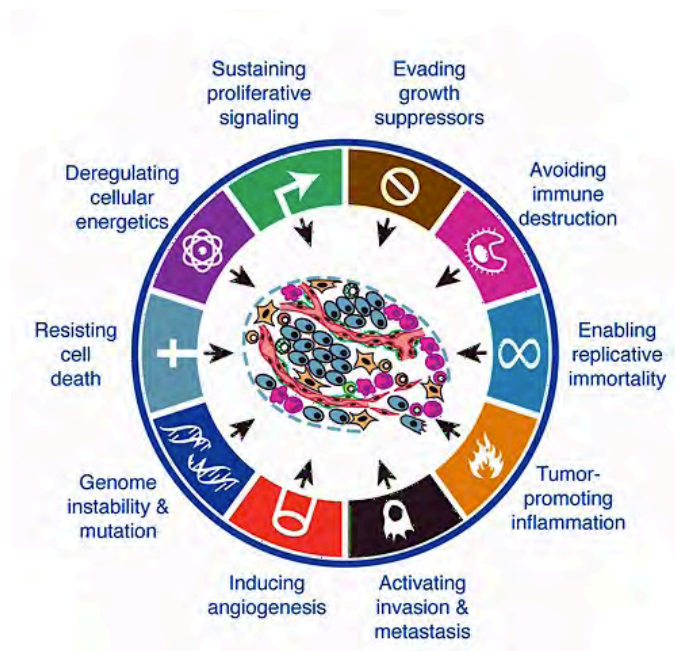


Figura 1. Características adquiridas del cáncer. El cáncer va adquiriendo una serie de características que le confieren propiedades malignas a lo largo de su desarrollo. Las capacidades propuestas en un principio (año 2000) son: mantenimiento de señales proliferativas, evasión de supresores de crecimiento, activación de invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular programada. En una versión más actual del trabajo, se han propuesto nuevas características: evasión del sistema inmune, promoción de la inflamación, inestabilidad genómica y mutaciones, desestabilización del metabolismo energético.

1.2.5 ACTIVACIÓN DE LA INVASIÓN Y LA METASTASIS

Tanto la red de vasos sanguíneos como la presencia de vasos linfáticos adyacentes a la neoplasia son factores importantes para las características más agresivas del cáncer: la invasión y la metástasis. Ambas propiedades adquiridas se caracterizan por poseer alteraciones en las moléculas de adhesión célula a célula y en la morfología celular. Estas cualidades le permiten a las células cancerosas colonizar otros tejidos mediante un proceso conocido como la «cascada de invasión y metástasis». Dicho proceso se caracteriza por una secuencia de pasos: invasión local; entrada a los vasos sanguíneos y/o linfáticos (intravasación); transición por los vasos; salida de los vasos (extravasación); formación de micrometástasis (semilla); y el crecimiento hacia un tumor macroscópico (colonización) [DeVita et al, 2008; Hanahan y Weinberg, 2011].

Un programa celular activo específicamente durante el desarrollo embrionario, conocido como la «transición epitelio mesénquima» es uno de los procesos responsables de gobernar la cascada de invasión y metástasis. Los factores de transcripción que orquestan este proceso durante la embriogénesis son: Snail, Slug, Twist y Zeb 1/2; factores que se han reportado expresados en un gran número de tumores. Sin embargo, el microambiente en el que se halla la neoplasia es clave para que se lleve a cabo la EMT. Estudios de genética del desarrollo han proporcionado evidencia sobre el papel de las células estromales asociadas al tumor en la inducción de la expresión del fenotipo maligno. Este mecanismo se puede llevar a cabo ante la expresión de los factores de transcripción mencionados anteriormente [Karnoub et al, 2007; Micalizzi et al, 2010].

Como resultado de la activación de este programa, las células tumorales adquieren un fenotipo parecido al de un linaje distinto, con características observadas en las poblaciones celulares de origen mesodérmico (mesenquimatosas): con gran plasticidad y sin uniones estrechas de célula a célula. Este proceso de reprogramación se conoce como transdiferenciación e implica un cambio en los patrones de expresión génica [Kalluri y Weinberg, 2009].

1.2.6 PROPIEDADES EMERGENTES

El grupo de Hanahan y Weinberg reportó otros dos tipos de propiedades adquiridas en la nueva versión de su publicación (2011) que clasificó como: «habilitadoras» y «emergentes». Las propiedades habilitadoras son aquellas que le permiten a la neoplasia adquirir los demás *hallmarks* con mayor eficiencia; con ello aumenta el potencial de progresión tumoral (Figura 1). La inestabilidad genómica y la persistente inflamación del tumor, son consideradas como propiedades habilitadoras por su capacidad de promover la adquisición de nuevas propiedades tumorigénicas.

Puesto que la gran mayoría de las neoplasias presenta alteraciones a nivel génico y cromosómico, el cáncer se considera como una enfermedad genética. Un mecanismo por el cual las células cancerosas adquieren estas alteraciones es la inestabilidad genómica, en la cual se presentan alteraciones en ciertos «genes guardianes» –responsables de la estabilidad genómica–, y por ello las células tumorales comienzan a presentar una acumulación acelerada de mutaciones.

Por otra parte, la infiltración de células del sistema inmune en la masa tumoral, también tiene un efecto sobre la adquisición de capacidades tumorigénicas por la constante secreción de factores de

crecimiento, factores de supervivencia y enzimas modificadoras de la matriz extracelular. Estos factores influyen en la proliferación celular, angiogénesis, invasión y metástasis, además de inducir la activación de la EMT.

Las propiedades clasificadas como «emergentes», se denominan como tal por ser características previamente no consideradas. La desregulación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune juegan un papel importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la reprogramación metabólica y la desregulación de los metabolitos en las células cancerosas, tiene como consecuencia un cambio en la expresión génica, la diferenciación celular y el microambiente tumoral. Por estas razones, se le considera a la reprogramación del metabolismo celular como un factor importante en la tumorigénesis [Pavlova y Thomson, 2016].

En cuanto a la evasión del sistema inmune, se ha visto que las células del sistema inmune tienen un papel importante en la limitación de la formación de tumores. De hecho, al sistema inmune se le considera como una barrera significativa para la formación y progresión tumoral. En estudios elaborados con ratones inmunodeficientes se señala que estos –a diferencia de ratones inmunocompetentes– desarrollan tumores con mayor frecuencia [Kim et al, 2007; Teng et al, 2008].

2. CÁNCER DE MAMA

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

Alrededor de 1.67 millones de mujeres en todo el mundo fueron diagnosticadas con cáncer de mama en el 2012 y se registraron aproximadamente 522,000 muertes ese mismo año [GLOBOCAN, 2012]. Se trata de la segunda neoplasia más común en todo el mundo y afecta principalmente a la población femenina. Este tipo de cáncer se presenta con frecuencias similares tanto en países desarrollados como los menos desarrollados.

En México el cáncer de mama es una de las neoplasias más diagnosticadas; siendo esta la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina. El año 2014 se reportó como el año con mayor incidencia de cáncer de mama. Con respecto al año 2007 en el cuál la incidencia en mujeres fue de 21.40 casos por cada 100 mil habitantes, para el año 2014 la incidencia aumentó hasta 28.75 casos. La tendencia va hacia la alta y se estima que cada año serán más los casos de cáncer. El grupo de edades en los que se presenta con mayor frecuencia este tipo de cáncer es entre los 60 y 64 años [INEGI, 2015].

2.2 CLASIFICACIÓN

El cáncer de mama se refiere a un conjunto de enfermedades que son genética, clínica y molecularmente muy heterogéneas [Stingl y Caldas, 2007]. Por esta razón el tratamiento de este tipo de patologías no ha sido el óptimo para todos los grupos de pacientes, dado que la resistencia a la terapia y la recurrencia tumoral son fenómenos frecuentes. Con la finalidad de optimizar los tratamientos clínicos para este conjunto de enfermedades se han propuesto diversos tipos de clasificación para organizar tal heterogeneidad. Actualmente, existen tres sistemas de clasificación: la histológica, la clasificación molecular y la fisiológica [Malhorta et al, 2010].

2.2.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La clasificación histológica es la más empleada en la clínica y tiene un valor pronóstico importante. De acuerdo con este tipo de clasificación, el cáncer de mama se distingue en dos tipos; carcinoma *in-situ* y el carcinoma invasivo. Ambas formas de la enfermedad pueden clasificarse en demás subtipos según sus características. Los carcinomas *in-situ* comprenden a un conjunto de tumores que clínicamente no se consideran invasivos. Según el sitio de la mama en el que se originan, pueden ser carcinomas del ducto o lobulares.

En cuanto al grupo de los carcinomas invasivos, la característica histológica fundamental es la infiltración del tumor en tejidos adyacentes a la mama como los nodos linfáticos. Los carcinomas invasivos se subdividen en seis tipos, sin embargo el que se presenta con mayor frecuencia (70-80% de los casos) es el carcinoma ductal infiltrante. Los demás tipos se presentan con mucha menor frecuencia y son los siguientes: tubular, ductal lobular, lobular invasivo, mucinoso, medular y papilar [Malhotra et al, 2010].

2.2.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR

La clasificación molecular proporciona un panorama más amplio de cada tipo de tumor basándose en la expresión de marcadores moleculares específicos. Mediante la tecnología de microarreglos, se puede estudiar la expresión génica de múltiples tumores extraídos de pacientes. Los patrones de expresión generados son agrupados por medio de programas bioinformáticos de acuerdo con la similitud entre las muestras tumorales. Mediante esta tecnología el grupo pionero de la clasificación molecular del cáncer [Sorlie et al, 2001] propuso cinco subtipos de cáncer de mama según los patrones de expresión génica que presentan. En estudios posteriores se identificó un sexto grupo a la lista de patologías [Herchskowitz et al, 2007]. En la tabla 1 se enlistan los diferentes subtipos moleculares y los biomarcadores empleados para definirlos.

Tabla 1. Subtipos intrínsecos* de cáncer según su clasificación molecular

Subtipo molecular	Frecuencia	ER/PR/HER-2	CK5/6 EGFR	Genes de Proliferación	Mutaciones TP53	Pronóstico
Basal-like	10-20%	ER- PR- HER2-	+	Alto	Alto	Malo
HER-2 positivo	10-15%	ER- PR- HER2+	+/-	Alto	Alto	Malo
Normal-like	5-10%	ER-/+ HER2- ER+ PR+	+	Bajo	Bajo	Intermedio
Luminal A	50-60%	HER2- ER+/- PR+/-	-	Bajo	Bajo	Exelente
Luminal B	10-20%	HER2-/+	-	Alto	Intermedio	Intermedio/malo
Bajo en claudinas	12-14%	ER- PR- HER2-	+/-	Alto	Alto	Malo

*La clasificación molecular del cáncer de mama se basa en el patrón de expresión génica que presenta cada tipo de tumor. Los tumores de tipo luminal presentan una sobreexpresión de ER o PR; los carcinomas HER-2 positivos presentan una sobreexpresión de este gen y no en receptores de estrógenos; los tumores triples negativos que no expresan ER, PR o HER-2 pueden presentar otro tipo de marcadores moleculares como CK5/6 o EGRF. Las mutaciones en TP53 también tienen valor pronóstico.

2.2.2.1 SUBTIPO LUMINAL

En la clínica se evalúan los marcadores ER, PR y HER-2 para dirigir el tratamiento y pronosticar el desarrollo de la enfermedad. Los primeros dos se sobreexpresan principalmente en el grupo luminal, conformado por luminal A y luminal B. El primero corresponde al subtipo más común de cáncer de mama dado que se presenta en el 50-60% de los pacientes. Sin embargo, este tipo de neoplasia cuenta con el mejor pronóstico. Para su tratamiento se emplean principalmente los inhibidores de la aromatasa (AI), moduladores selectivos de estrógenos o reguladores selectivos de receptores de estrógenos (p.ej., tamoxifeno). El subtipo luminal B tiene un peor pronóstico. El principal tratamiento de este subtipo es la quimioterapia con antraciclinas y taxanos porque este subtipo se caracteriza por tener un mayor índice proliferativo. En algunos casos también se utiliza la terapia endocrina para su tratamiento [Eroles et al, 2011].

2.2.2.2 SUBTIPO HER-2 POSITIVO

Los tumores HER-2 positivos engloban a todas las neoplasias que presenten un aumento en la expresión del receptor HER-2 o de algún elemento de las vías de señalización que este active. HER-2 es un receptor de tipo tirosín cinasa cuya activación promueve la señalización por vías asociadas con la proliferación, crecimiento, muerte, división, migración y supervivencia celular, lo cuál hace que este tipo de cáncer sea considerado el subtipo con el peor pronóstico. La señalización por las vías de las MAP cinasas, PI3K/AKT/mTOR y de JAK/STAT es la principal causa de la proliferación exacerbada en este tipo de tumores, por lo que para su tratamiento se emplean inhibidores tanto para el receptor (trastuzumab) como agentes antimitóticos (p. ej., nocodazol) en contra de tumores con alto índice proliferativo.

2.2.2.3 SUBTIPOS TRIPLE NEGATIVOS

Los subtipos triple negativos son todos aquellos que no expresan los biomarcadores típicos y se subclasifican por otro tipo de marcadores. El subtipo *basal-like* expresa genes característicos de células mioepiteliales como las citoqueratinas CK5 y CK17. De hecho, el perfil inmunohistoquímico de este tipo de cáncer se basa en la presencia o ausencia de las proteínas: ER, PR, HER-2, EGFR y CK5/6 (Tabla 1).

El subtipo «bajo en claudinas» se caracteriza por la baja expresión de genes involucrados con uniones estrechas y adhesión intracelular como las claudinas, cingulinas, ocludinas y E-caderina. Sin embargo, sobreexpresan genes relacionados con la respuesta inmune, lo cuál indica que este tipo de tumores presentan infiltración de células del sistema inmune. Por otro lado, sobreexpresan genes relacionados con los procesos de diferenciación mesenquimal y de transición epitelio-mesénquima, ambos asociados con la adquisición del fenotipo de células troncales cancerosas (CSC), las cuáles se describirán más adelante.

2.2.2.4 SUBTIPO NORMAL-LIKE

En comparación con los demás subtipos este tipo de cáncer de mama se presenta con menor frecuencia en la población mundial (Tabla 1). En este subtipo se presenta un patrón de expresión génica similar al de otros tejidos de la mama, como es el tejido adiposo y el muscular. Sin embargo, también puede presentar una expresión de ER. La verdadera existencia de este subtipo de cáncer de mama es cuestionada y se propone

que este subtipo surge como consecuencia de una contaminación de la biopsia con dichos tejidos a la hora de la toma de muestra tumoral del paciente.

2.2.3 SUBTIPOS FISIOLÓGICOS DE CÁNCER DE MAMA

Actualmente se considera que los tumores de mama presentan una jerarquía análoga a la de los órganos normales del cuerpo. En la parte superior de la jerarquía se encuentran un conjunto de células con un fenotipo troncal, las CSC. Se considera que presentan un fenotipo troncal por su capacidad de autorrenovación y de diferenciarse en otros tipos celulares. Se ha visto que este tipo de células son capaces de recapitular la heterogeneidad tumoral al momento de ser xenotransplantadas en ratones. Dichas células se pueden aislar del resto de la masa tumoral empleando marcadores específicos. Al emplear marcadores específicos para las CSC se pueden generar terapias dirigidas contra estos tipos celulares y evitar la reaparición del tumor después del tratamiento [Marhotra et al, 2010].

2.3 HETEROGENEIDAD TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA

Los diferentes tipos de cáncer presentan dos tipos de heterogeneidad: la heterogeneidad intertumoral y la intratumoral. Ambos tipos de heterogeneidad son observables bajo criterios histológicos, sin embargo, se ha determinado que los tumores no sólo varían en características morfológicas o clínicas sino que presentan diferentes marcadores moleculares tanto entre pacientes (heterogeneidad intertumoral) como en el mismo tumor (intratumoral). Se ha propuesto que la heterogeneidad tumoral puede ser la característica responsable de la progresión tumoral, la metástasis, la resistencia a la terapia y la recurrencia. La metástasis, junto con la recurrencia tumoral después del tratamiento, representan el 90% de muertes por cáncer [Doherty et al, 2016; Spano et al, 2012].

Actualmente se han postulado dos modelos para explicar la heterogeneidad intratumoral. El modelo estocástico propone que los cambios genéticos en las células tumorales surgen a partir de un proceso de selección natural. Es decir, las características que adquieren las células cancerosas pueden ser favorables o desfavorables, siendo las primeras las más importantes para la expansión clonal [Tabassum y Polyak, 2015]. En este modelo se considera que las células neoplásicas con características genéticas ventajosas pueden desarrollar un fenotipo invasivo y/o metastásico con cambios favorables adicionales [Aabo et al, 1995; Weinberg, 2007 et al, Nguyen et al, 2016].

Un modelo cada vez más aceptado por la comunidad científica es el modelo jerárquico para explicar la heterogeneidad tumoral. En este, se propone que el tumor es una organización jerárquica de células biológicamente distintas, siendo las CSC las únicas capaces de promover la progresión tumoral. Se considera, para este modelo, que las CSC son las responsables del mantenimiento de las demás subpoblaciones celulares, las cuales son incapaces de aportar malignidad a la neoplasia, pero que contribuyen principalmente a la expansión clonal por sus capacidades proliferativas. La importancia clínica y una descripción más profunda de este modelo se explicará más adelante, en la sección del cáncer de mama, cuya organización tumoral muestra una de las jerarquías más evidentes.

2.4 LAS CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER DE MAMA

Las CSC se pueden definir por su habilidad tumorigénica y de regenerar la heterogeneidad de un tumor primario ante su trasplante en ratones, por lo cual también se les considera como células iniciadoras de tumor (TIC). Este tipo de células presentan características típicas de una célula troncal adulta normal, es decir, la autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares. El origen de las CSC es una cuestión que no se ha descrito totalmente. Se plantean dos hipótesis con respecto a su origen: i) a partir de la transformación de células troncales normales y/o ii) la dediferenciación o reprogramación de células diferenciadas de la masa tumoral [Nassar y Blanpain, 2016]. La plasticidad de las CSC se refiere a la capacidad que tienen las células cancerosas de sufrir cambios reversibles con respecto al fenotipo troncal. Este fenómeno se ha comprobado mediante diversas condiciones experimentales; por ejemplo, empleando ciertos factores como la quimioterapia se puede inducir un fenotipo troncal. Cuando estos factores son retirados, las CSC vuelven a un fenotipo diferenciado [Doherty et al, 2016].

En cáncer de mama se ha identificado y aislado a la población de CSC o TICs utilizando los marcadores CD44+/CD24-, ALDH1+ y EpCAM+ [Ginestier et al, 2007; Imrich et al, 2012]. Esta población celular tiene la capacidad de iniciar tumores en ratones inmunodeficientes aun cuando son inoculadas sólo 20 células. Actualmente se proponen diversos agentes dirigidos contra las CSC de cáncer de mama, algunos en fases de ensayos preclínicos y clínicos. Algunos de estos agentes son inhibidores dirigidos contra Hedgehog (Hh), NOTCH, Akt y CXCR1 [McDemott y Wicha, 2010]. Varias vías de señalización participan en el mantenimiento del fenotipo troncal en las células cancerosas y sus elementos pueden ser blancos terapéuticos; por ejemplo, se ha visto que el factor de transcripción STAT3 está preferentemente activado en este tipo de células en comparación con el resto de las células que componen a la neoplasia [Thakur et al, 2015; Yuan et al, 2015].

3. IKBKE

IKBKE es un oncogén sobreexpresado en cáncer de mama, ovario, páncreas, entre otros [Verhelst K et al, 2013]. En cáncer la expresión de este oncogén está asociada a la proliferación y la supervivencia [Boehm et al, 2007]. El gen de IKBKE codifica para IKK ϵ (*Inhibitor of nuclear factor Kappa b Kinase subunit epsilon*, por sus siglas en inglés, Cinasas del Inhibidor del Factor Nuclear kappa B, subunidad épsilon), una proteína cinasa perteneciente a la familia de las IKKs (Cinasas del Inhibidor del Factor Nuclear kappa B).

La familia de las IKKs comprende a cuatro miembros y sus correspondientes isoformas. Todos los integrantes de la familia participan en la fosforilación de una cinasa inhibidora del factor de transcripción NF-kB, I κ B (Inhibidor de kappa B). Dependiendo de qué vía se active durante el proceso, las cinasas van a pertenecer al grupo de la vía canónica o no canónica y se describen a continuación.

3.1 IKKs CANÓNICAS

En el caso de la vía canónica cuyo desencadenamiento depende de la activación de receptores de membrana como TNF-R1, IL-1R, TLR4, se activan las cinasas IKK α y IKK β . Estas cinasas duales participan en la activación de NF-kB al fosforilar a I κ B permitiendo la liberación y subsecuente translocación al núcleo de NF-kB. Al interior del núcleo NF-kB cumple el papel de un factor de transcripción, alterando la expresión de diversos

genes implicados en la respuesta inmune innata, proliferación, supervivencia y diferenciación . [Hoesel y Schmid, 2013; Verhelst K et al, 2013].

3.2 IKKs NO CANÓNICAS: IKKε Y TBK1

Las cinasas relacionadas con las IKKs canónicas son IKKε y TBK1 y comparten un 30% de homología de secuencia con las IKK's de la vía canónica. La función de ambas cinasas depende de la activación de receptores citosólicos o de membrana como TLR3, TLR4 y RIG-1. Ante su activación, las cinasas fosforilan a IκB y permiten la translocación de NF-κB o IRF3 al núcleo. Dentro del núcleo, estos factores transcripcionales participan en la transcripción de genes relacionadas con la respuesta inmune, la proliferación celular y supervivencia. Entre los genes que se expresan ante la señalización de IKBKE se encuentran las citocinas, los interferones, factores de crecimiento y genes asociados a la regulación de la muerte celular [Niederberger et al, 2013].

3.3 IKBKE COMO ONCOGÉN DE CÁNCER DE MAMA

Las mutaciones que ocurren en oncogenes son cruciales para el proceso de carcinogénesis [Osborne et al, 2004]. Las cinasas oncogénicas juegan un papel importante en varios tipos de cáncer y por lo mismo, se consideran como blancos terapéuticos importantes. La cinasa IKKε ha sido reconocida como un oncogén de cáncer de mama dado que se encuentra amplificada y/o sobreexpresada en un 30% de los tumores de mama [Hutti et al, 2009].

En un estudio que emplea enfoques genómicos integrativos para identificar una serie de cinasas con actividad oncogénica en cáncer de mama, se reconoce a IKBKE como una cinasa sobreexpresada en líneas celulares y tumores de mama capaz de promover la transformación celular mediante la activación de la vía de señalización de PI3K [Boehm et al, 2007]. En estudios posteriores se demostró que IKBKE puede activar directamente a AKT y por ende la señalización río debajo de PI3K [Guo et al, 2011]. La activación de las cinasas PI3K y ERK es suficiente para la transformación celular, sin embargo, el potencial de transformación por IKBKE parte de la activación de NF-κB y suprimir la actividad de esta cinasa provoca la muerte celular [Boehm et al, 2007].

Recientemente, se encontró un subtipo de cáncer de mama triple negativo que sobreexpresa IKBKE y produce citocinas protumorigénicas IL-6 y CCL-5. La inhibición de IKBKE y la vía de JAK mediante un inhibidor (CYT387) provoca la incapacidad proliferativa de células de TNBC, así como una baja en la dispersión de esferoides tumorales en cultivos 3D [Barbie et al, 2014].

II JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mortalidad a causa de cáncer en la población femenina. Este tipo de cáncer engloba un conjunto de enfermedades ampliamente heterogéneas que se pueden subtipificar según sus patrones de expresión génica. Recientemente, en varios tipos de cáncer se encontró una población celular compuesta de células con fenotipo troncal (CSC) con capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación a diversos linajes. Se considera que esta población celular es la

responsable de la heterogeneidad tumoral y la resistencia a terapia. Existen diversos mecanismos por los cuáles se pueden alterar los patrones de expresión génica que contribuyen a la expresión de un fenotipo troncal. Dado que IKBKE es un oncogén en cáncer de mama que se ha visto implicado en la regulación de vías de señalización relacionadas con la tumorigénesis y el mantenimiento del fenotipo troncal, puede ser un importante blanco terapéutico. Sin embargo, la actividad de IKBKE sobre las diferentes vías de señalización implicadas en estos procesos se desconoce. El método de RNA-seq permite la visualización de todos los cambios ocurridos en los patrones de expresión génica tras diferentes estímulos. El análisis del transcriptoma completo ante la sobreexpresión de IKBKE en líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7 podría proporcionar información de relevancia sobre los mecanismos por los cuáles IKBKE actúa como un oncogén y su posible relación con el fenotipo troncal.

III HIPÓTESIS

La expresión forzada de IKBKE en la línea MCF-7 podría afectar los patrones de expresión génica y repercutir en procesos relacionados con la carcinogénesis y el mantenimiento del fenotipo troncal.

IV OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar cambios en los patrones de expresión génica en la línea celular MCF-7 relacionados con la sobreexpresión de IKBKE.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Transfectar la línea celular MCF-7 con un vector de expresión que contiene la secuencia del gen IKBKE.
- Corroborar la sobreexpresión de IKBKE mediante PCR en tiempo real.
- Extraer RNA de la línea celular transfectada y comprobar su integridad y calidad.
- Secuenciar el transcriptoma para analizar cambios en la transcripción génica ante la sobreexpresión de IKBKE.
- Realizar un análisis de los cambios en el transcriptoma por IKBKE documentando los procesos biológicos implicados.

V MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Con la finalidad de evaluar el efecto carcinogénico del oncogén IKBKE en la línea celular MCF-7 se usaron dos plásmidos. Uno de ellos, pT-REx/GW30/lacZ (Thermo Fisher Scientific), sirvió como control del experimento. El segundo plásmido denominado pcDNA3-flag-Ikke fue empleado para evaluar los efectos del oncogén. Ambos plásmidos se emplearon para la transformación de la cepa DH5 α de bacterias *Escherichia coli*.

1.1 TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS *E. COLI*

Para transformar las bacterias se empleó el protocolo del juego de reacciones de TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific, K2710). Brevemente, las bacterias *Escherichia coli* fueron sembradas en una placa de Petri a 37°C por 24 horas. Posteriormente una porción de bacterias se resuspendió en 1.5 mL de medio-C y se incubó a 37°C en agitación por 2 horas. Seguido, las bacterias se centrifugaron por un minuto y el pellet se resuspendió en 300 μ L de solución-T y se incubó durante 5 minutos. Nuevamente, las bacterias se centrifugaron por un minuto y se resuspendieron en 120 μ L de solución-T. Después de incubar nuevamente por 5 minutos, a cada tubo se le adicionó 1ng de plásmido control y 1ng de plásmido-IKBKE respectivamente. Después de agitar la muestra, se realizó un choque térmico de un minuto a 47°C. Finalmente, 30 μ L de cada mezcla de bacterias transformadas fueron cultivadas en medio LB con antibiótico (Ampicilina a 100 μ g/mL) por 12 horas a 37°C.

1.2 EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Las colonias resistentes se asilaron y se cultivaron durante 12 horas en 250 mL de medio LB con ampicilina. Seguido, las bacterias fueron centrifugadas a 6,000 rpm durante 10 minutos y los plásmidos se extrajeron utilizando el juego de reactivos Hi-Speed Midi Prep Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el precipitado de bacterias fue tratado con 6 mL de Buffer P1 hasta solubilizarse completamente. Luego se adicionó el Buffer P2 y se incubó por 5 minutos. Posteriormente, se agregó buffer P3 frío y la mezcla se incubó por 10 minutos. Pasado el tiempo, para precipitar el DNA del lisado celular se adicionaron 3.5 mL de isopropanol y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. El lisado celular fue eluido con etanol al 70% y el DNA se recuperó con 500 μ L de Buffer TE.

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos se evaluó y cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000, ThermoScientific). Los plásmidos obtenidos fueron empleados para transfectar a las células MCF-7.

2. CULTIVO DE CÉLULAS MCF-7

La línea celular MCF-7 fue mantenida con medio EMEM (ATCC® 30-2003™) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (EMEM-5%) en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

2.1 SIEMBRA

Ante una confluencia del 90% las células fueron despegadas de la placa Petri empleando 0.7 mL Buffer Salino

de Fosfatos 1X (PBS-1X) con Tripsina y EDTA por 3-4 minutos. Para inhibir la acción de la proteasa se adicionó EMEM-5%. Las células fueron recolectadas y centrifugadas a 1,300 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio EMEM-5% y contadas al microscopio. Finalmente, se sembraron 1.3×10^6 células en cajas de 35 mm para cada condición por triplicado.

2.2 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Para la transfección transitoria de las células MCF-7 se emplearon los reactivos de transfección Xfect™ (No. Cat. 631317) y se siguió el protocolo provisto por el fabricante (Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company). Primeramente, se combinó 1.5 uL de Xfect™ con 5 ug de plásmido en un volumen de 100 uL junto con el buffer de reacción. La mezcla se dejó incubar por 10 minutos. Cada placa se trató con 100 uL de la mezcla de transformación y 700 uL de medio EMEM-5%. Se dejó incubar por 42 horas. Pasado el tiempo, se procedió a analizar la expresión génica y eficiencia de la transfección.

Para determinar la eficiencia de la transfección se comparó el número de células fluorescentes contra el número total de células. Primeramente se contó el total de células y se le equiparó al 100%; posteriormente se contaron únicamente las células que presentaron fluorescencia y se obtuvo el porcentaje.

3. EXTRACCIÓN DE RNA

Para realizar la extracción de RNA, las células con 90% de confluencia fueron lavadas con 1 mL de PBS1X y despegadas con un gendarme estéril. Después de ser recolectadas, las células se centrifugaron a 1,200 rpm por 5.0 min a 4°C. La pastilla se resuspendió con 1 mL de Trizol® (Thermo Fisher Scientific) y después con 200 uL de cloroformo. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. Al separarse las tres fases, se recuperó la fase transparente (RNA) y se mezcló con el mismo volumen de isopropanol (1:1 ó v/v) y se incubó a -20°C por 30 minutos.

Pasado el tiempo, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% diluido con agua DEPC (dietil dicarbonato) para hacer un primer lavado y se centrifugó a 7,500 rpm por 10 minutos a 4°C. Al finalizar, se volvió a hacer el lavado con etanol y después de la centrifugación la pastilla de RNA fue secada y resuspendida en 30uL de agua libre de nucleasas. La calidad y cantidad de la extracción se observó mediante el espectrofotómetro NanoDrop™.

4. VALIDACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE IKBKE

Para corroborar la sobreexpresión de IKBKE por RT-qPCR en los cultivos transfectados se emplearon dos técnicas: la reversotranscripción (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.1 RT

Para generar cDNA a partir de las muestras de RNA obtenidas de los cultivos, se usaron las indicaciones del juego de reacciones de *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* para RT-qPCR con dsDNasa (*Thermo Scientific*, #K1672). Brevemente, se empleó 1uL del Buffer 10x, 1uL de la dsDNasa, 500 ng de RNA y la reacción se ajustó a 10 uL de reacción con agua libre de nucleasas (Milli-Q). La mezcla de reactivos se incubó por 2 minutos a 37°C y posteriormente se agregó 4 uL de la solución de reacción 5X, 2 uL de la solución de la

enzima *Maxima* y finalmente la reacción se completó con 4 uL de agua libre de nucleasas. La reacción se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°, 15 minutos a 50° y 5 minutos a 85°.

4.2 PCR CUANTITATIVA

A partir del cDNA generado en el paso anterior, se prosiguió a determinar la sobreexpresión de IKBKE en los cultivos transfectados. Para llevar a cabo la reacción se emplearon oligos contra la secuencia del gen IKBKE donde el oligo sentido presenta la secuencia: 5'-AACGAGGAGCAGATTCACA-3'; y el antisentido presenta la secuencia 5'-GTCCTGAAGGAGCTG GTGAG-3'. Para cada reacción se emplearon 10 uL de la solución de reacción (Reaction Mix), 0.3 uM de cada oligo y 12.5 ng de cDNA, para completar la reacción se añadió agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 uL. Para normalizar los resultados se emplearon cebadores contra TBP (*TATA Binding Protein*), donde la secuencia sentido (F) es 5'-CCACAGCTGTTCCACTCACA-3' y la secuencia antisentido (R) es 5'-CTGATGATTACCGCAGCAAA-3'.

Para calcular la expresión relativa o *fold change* (FC) de cada gen de interés se emplearon los valores del ciclo umbral (CT) obtenidos y se les restó el valor CT del gen constitutivo TBP (Δ CT). A continuación, para saber qué tanto cambian los valores de las muestras transfectadas con pIKBKE con respecto a las muestras control, los valores CT del gen TBP pertenecientes a las muestras control se promediaron y se restaron al Δ CT obtenido en el paso anterior (Δ CT- Δ CT ó $\Delta\Delta$ CT). Por último, para sacar el FC se ajustan los valores quitando el logaritmo mediante la ecuación: $2^{-\Delta(\Delta\text{CT})}$.

5. RNA-SEQ

Para analizar los cambios en la expresión génica a nivel del transcriptoma, cada muestra de RNA obtenida de los cultivos transfectados fue evaluada y secuenciada.

5.1 CONTROL DE CALIDAD

La calidad de cada muestra de RNA fue evaluada según su corrida electroforética e intensidad luminosa con el bioanalizador Aligent RNA 6000 Nano. El software proporcionado por el bioanalizador asignó un número de integridad del RNA (RIN) a cada muestra. Para la secuenciación sólo se emplearon muestras con un RIN mayor a los 9 puntos.

5.2 SECUENCIACIÓN

La secuenciación total de las muestras de RNA fue realizada mediante el equipo NextSeq500 (Illumina) por la Unidad de Secuenciación e identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMeGen). La secuenciación de transcriptoma completo permite detectar RNA codificante y varias formas de RNA no codificante. El método consiste en conversión de RNA a cDNA; la ligación de secuencias adaptadoras; secuenciación de los productos para la obtención de lecturas cortas; y finalmente, la alineación de las lecturas con secuencias genómicas para su identificación.

5.3 ANÁLISIS DEL TRANSCRITOMA Y SELECCIÓN DE GENES DIFERENCIALES

Los datos del transcriptoma se analizaron con el programa *CLC Genomics*, (versión 7.0 CLC Bio-Quiagen) por el Dr. Jorge Meléndez Zajgla. Para el análisis bioinformático, se emplearon los siguientes parámetros: para el alineamiento se consideró un máximo de 2 *mismatches*, 0.9 para la fracción de «largo mínimo», fracción de similitud de 0.8 y un máximo de 2 *hits* por lectura. El «rango de mapeo» 16×10^6 a 28×10^6 . Los transcritos con niveles relativos de expresión menores a 2 o con menos de 10 lecturas fueron excluidos. El análisis empírico de la expresión génica fue calculado usando el algoritmo de *Edge (Extraction of Differential Gene Expression)*. Para el análisis en el programa *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* sólo fueron considerados los genes con cambios en la expresión mayores de 2 y un valor de $p < 0.05$.

5.4 VALIDACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN

Para la validación de la secuenciación se emplearon los siguientes oligos para la qPCR:

- S100A7 (F: CCAACTTCCTTAGTGCCTGTG y R: AATCTTCTTATCCTCATTCTTGTCTT)
- CCL5 (F: ACCGCCAAGTGTGTGCCAA y R: GTTCAGGTTCAAGGACTCTCCATCC)
- CXCR4 (F: TCCACGCCACCAACAGTCAGAG y R: TCCAGACGCCAACATAGACCACC)
- CXCL17 (F: AGCACACCTACCAGACTC y R: GGCTAAGACTGACGAGAGAAGA)
- LIF (F: ACGAGGATGTGGCTGTTGAGA y R: TGAAGCAGGAAGGAGAAGGCA)

6. IPA

Para analizar los datos del transcriptoma se empleó el programa bioinformático IPA (QIAGEN) www.ingenuity.com. El programa funciona como una base de datos para interpretar los resultados obtenidos de la secuenciación. Para el análisis de transcriptoma completo se presentan las opciones para analizar genes alterados que participan en vías de señalización y procesos biológicos, su asociación con enfermedades y padecimientos hereditarios.

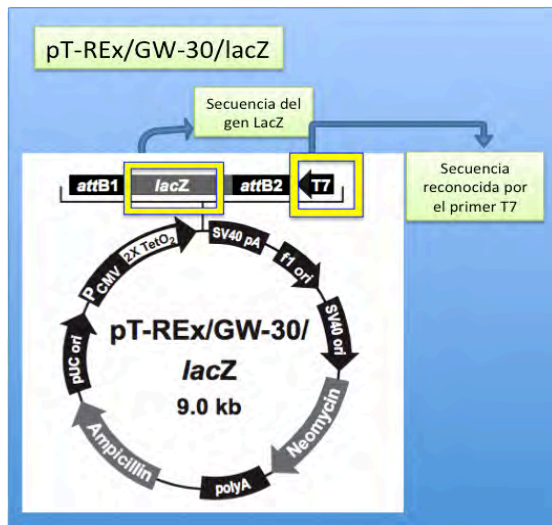
VI RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PCDNA3-FLAG-IKKE Y PT-REX/GW-30/LACZ

Los plásmidos que se utilizaron para la transfección de las células MCF-7 fueron extraídos a partir de colonias resistentes de *E. Coli* y caracterizados por programas bioinformáticos y secuenciación. El plásmido que se empleó como control del experimento pT-REx/GW-30/lacZ (Figura 3A) presenta una secuencia génica correspondiente al gen bacteriano LacZ. El plásmido que contiene la secuencia de interés –denominado como pcDNA3-flag-ikke– contiene la secuencia del gen IKKE (Figura 3B). Por simplicidad, se le referirá al plásmido pcDNA3-flag-ikke como pIKKE y al plásmido control, pLacZ o control.

Para verificar la identidad de ambos plásmidos, estos fueron secuenciados con el primer T7. En los electroferogramas obtenidos se muestra la secuencia de nucleótidos (Figura 4A y 4B). Posteriormente, la secuencia fue analizada por la base de datos de NCBI-BLAST para determinar la presencia de la secuencia de IKBKE en el plásmido de pIKBKE y del gen LacZ en el plásmido control (Figura 5). Se encontró la homología de secuencia esperada para cada plásmido; tal que en el plásmido pIKBKE se identificó la secuencia del gen IKBKE y para el plásmido control se identificó la secuencia del gen LacZ.

A) Estructura de pT-REx/GW-30/lacZ (control)



B) Estructura de pcDNA3-flag-ikke (pIKBKE)

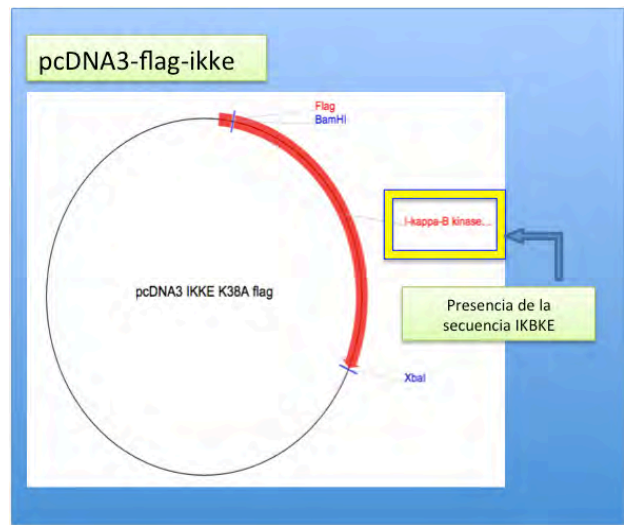
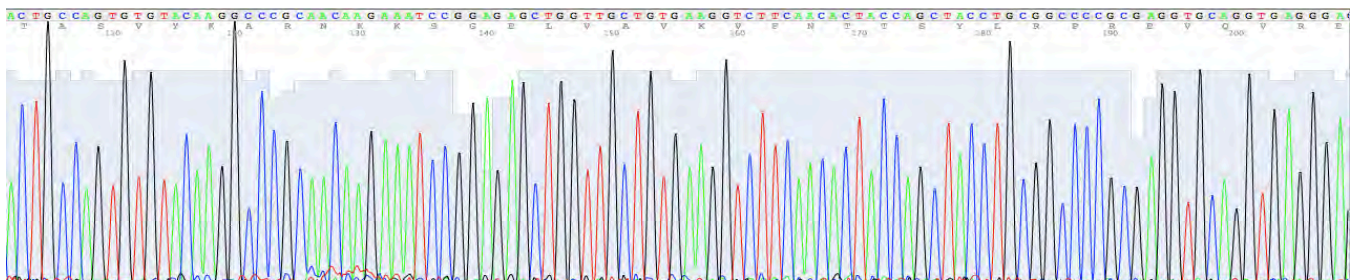


Figura 3. Estructura de los plásmidos empleados para la transfección transitoria de MCF-7. A) Estructura del plásmido pT-REx/GW-30/lacZ (control), el plásmido presenta una secuencia para el gen LacZ, el cuál no tiene ningún significado biológico en células eucariontes; B) Estructura del plásmido pcDNA3-flag-ikke, contiene la secuencia de interés para el gen IKBKE.

A) Captura del electroferograma obtenido de la secuenciación de pT-REx/GW-30/lacZ



Continuación de la figura...

B) Captura del electroferograma obtenido de la secuenciación de pcDNA3-flag-ikke

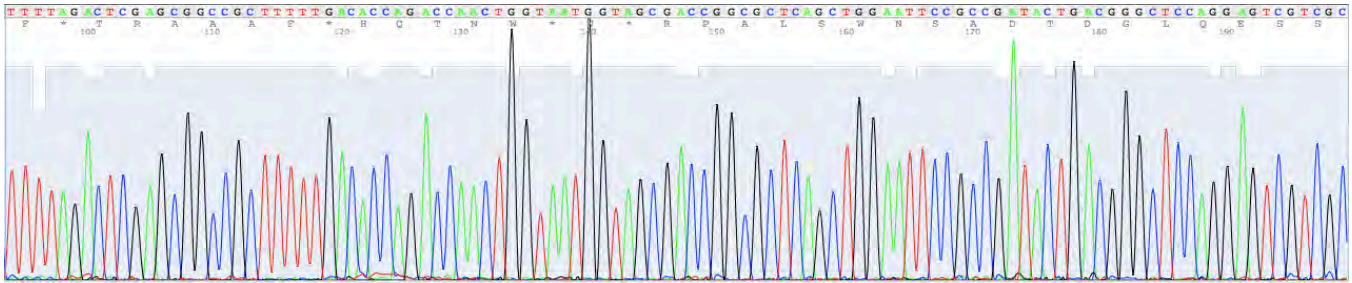


Figura 4. Electroferogramas de la secuenciación capilar. Se muestra la secuencia de nucleótidos correspondientes al inserto de cada plásmido A) CONTROL y B) pIKBKE obtenida tras la secuenciación.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant X3, misc RNA	1844	1844	91%	0.0	98%	XR_922002.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant X1, mRNA	1844	1844	91%	0.0	98%	XM_005273356.2
<input type="checkbox"/> Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant 2, mRNA	1844	1844	91%	0.0	98%	NM_001193322.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant 1, mRNA	1844	1844	91%	0.0	98%	NM_014002.3
<input type="checkbox"/> Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant 3, mRNA	1677	1677	83%	0.0	98%	NM_001193321.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon (IKBKE), transcript variant X2, mRNA	1194	1680	83%	0.0	97%	XM_017002868.1
Genomic sequences [show first]						
<input type="checkbox"/> Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1	339	1791	85%	7e-90	100%	NC_018912.2
<input type="checkbox"/> Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p7 Primary Assembly	339	1791	85%	7e-90	100%	NC_000001.11

Figura 5. BLAST de los resultados de secuenciación. En la captura del análisis generado por NCBI-BLAST se observa la presencia de la secuencia del gen IKBKE.

2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA Y SOBREENPRESIÓN DE IKBKE.

Para conocer la eficiencia de la transfección de la línea celular MCF-7, esta fue transfectada con un plásmido que contiene la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP). Después de 48 horas de la transfección se observaron las células que emiten fluorescencia con respecto al número total de células en el campo. Se determinó que alrededor del 80% de células MCF-7 presentan el plásmido fluorescente (Figura 6).

Al determinar que la eficiencia de la transfección fue óptima, se procedió a evaluar la expresión del gen IKBKE y para ello, las células MCF-7 se transfectaron con el plásmido pIKBKE y con el plásmido control; en total, se emplearon seis muestras para analizar los resultados de este experimento. En la tabla 2 se describe la condición experimental empleada para cada transfección.

Pasadas 48 horas de la transfección, se corroboró mediante RT-qPCR la sobreexpresión del gen IKBKE en los cultivos. Para ambas condiciones experimentales (Tabla 2) se usaron *primers* para la secuencia de IKBKE (Figura 7A). El gen constitutivo *TATA Binding Protein* (TBP) fue empleado para normalizar los resultados (Figura 7B). Finalmente, la expresión de IKBKE fue cuantificada mediante el ciclo umbral (CT) de cada muestra (Tabla 3).

La diferencia en el valor del *fold change* (FC) entre las muestras indica que las transfectadas con el plásmido pIKBKE expresan niveles significativamente más altos del gen IKBKE en comparación con las muestras transfectadas con el plásmido control (Figura 8).

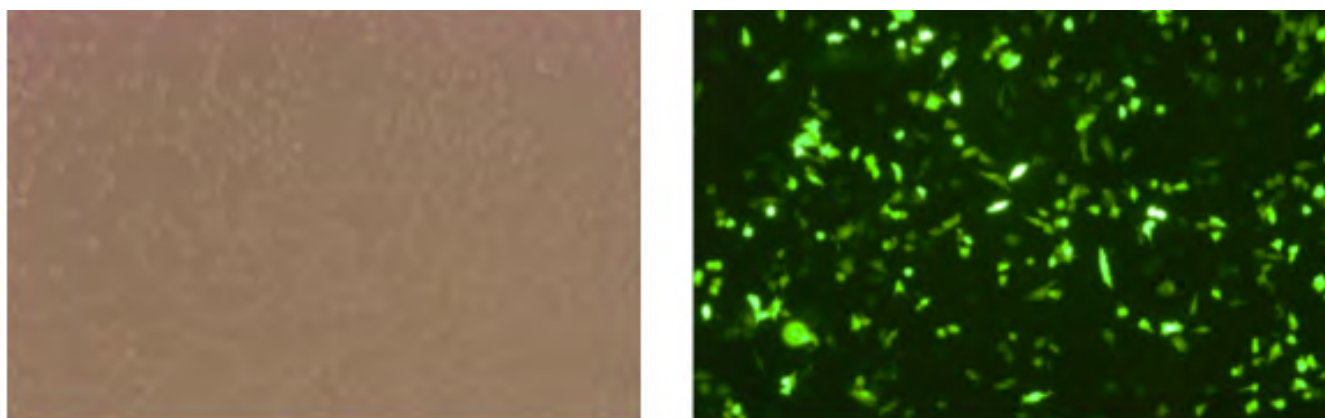


Figura 6. La eficiencia de la transfección en MCF-7 es óptima. La imagen de la izquierda representa el total de células observadas. La imagen de la derecha presenta células que incorporaron el plásmido verde fluorescente. Al comparar ambas imágenes se calculó alrededor de un 80% de células transfectadas (fluorescentes).

Tabla 2. Diseño experimental para la transfección de las células MCF-7

Plásmido empleado	Condición experimental	Descripción
pcDNA3-flag-ikke (pIKBKE)	IKBKE 1 IKBKE 2 IKBKE 3	1.3x10 ⁶ células MCF-7 transfectadas con el vector pIKBKE para sobreexpresar el gen de interés IKBKE.
pT-REx/GW-30/lacZ (control)	CONTROL 1 CONTROL 2 CONTROL 3	1.3x10 ⁶ células MCF-7 transfectadas con el vector pLacZ como control experimental.

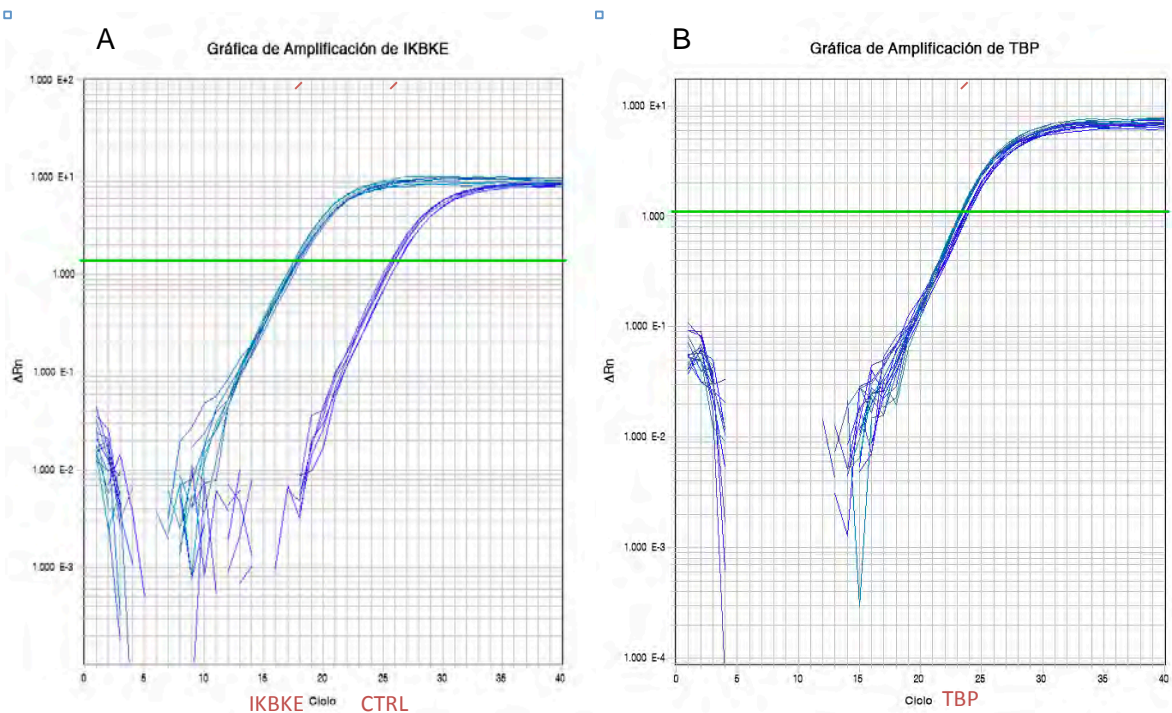


Figura 7. Gráficas de amplificación por qPCR. Se muestran las curvas de amplificación de los genes (A) IKBKE y (B) TBP; el ciclo umbral (CT) está denotado por la línea verde que cruza ambas gráficas. (A) La agrupación de curvas alrededor del ciclo 18 corresponde a las muestras transfectadas con pIKBKE, mientras que la agrupación de curvas alrededor del ciclo 26 corresponden a las muestras control. (B) Las curvas agrupadas cerca del ciclo 23 corresponden a todas de las muestras y no hay distancias considerables entre las curvas.

Tabla 3. Cambios en la de las seis muestras experimentales

MUESTRA	(Ct) TBP	(Ct) IKBKE	Δ CT	Δ CT- Δ CT	FC
IKBKE 1	23.3753	17.963387	-5.411913	-7.812929333	224.8671851
IKBKE 2	23.448606	17.786919	-5.661687	-8.062703333	267.371769
IKBKE 3	23.229391	17.87087	-5.358521	-7.759537333	216.6972948
CTRL 1	23.646229	26.288218	2.641989	0.240972667	0.846174628
CTRL 2	23.262436	25.748192	2.485756	0.084739667	0.942954676
CTRL 3	23.869743	25.945047	2.075304	-0.325712333	1.253283097
PROMEDIO ΔCT			2.401016333		

*Se muestran los valores del ciclo umbral (CT) para cada condición experimental por triplicado y los cálculos correspondientes para obtener el valor de cambio *Fold change* (FC).

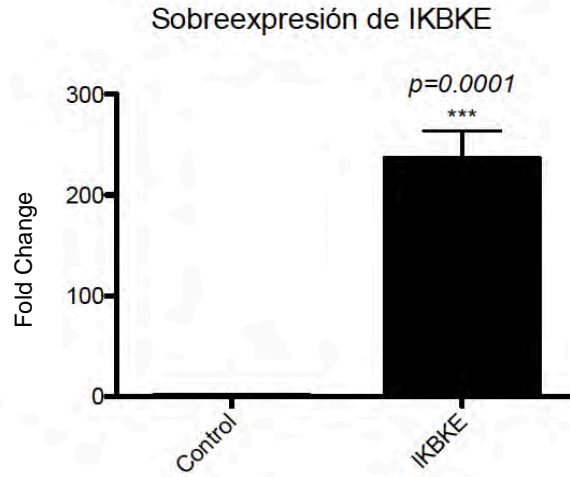


Figura 8. Expresión del gen IKBKE en las muestras transfectadas. La expresión del oncogén IKBKE es significativamente mayor en las muestras obtenidas de la transfección con el plásmido pIKBKE en comparación con el grupo de muestras transfectadas con el plásmido control.

3. CALIDAD DEL RNA

Para realizar el RNA-seq de las muestras transfectadas se evaluó primero la calidad del RNA extraído. Para conseguirlo, se emplean programas computacionales que aplican un algoritmo para evaluar el estado de electroforesis de cada muestra de RNA. Este proceso arroja información tanto sobre la relación ente las bandas de rRNA generadas (28S:18S), como la presencia o ausencia de productos degradados.

En la figura 9 se presenta la corrida electroforética de las muestras control y las que sobreexpresan IKBKE. En cada carril se generó un bandeo virtual designando a los RNAs más abundantes y las subunidades ribosomales 18 y 28S, la abundante cantidad de 28S es un indicativo que el RNA extraído no se encuentra degradado ni contaminado. Los electroferogramas de cada una de las muestras se presentan en la figura 10.

Los resultados de la electroforesis fueron analizados y graficados para designar un valor de integridad a cada muestra de RNA. Este valor se conoce como el «valor de integridad del RNA» (RIN) y debe ser mayor a 9.0 para proceder con la secuenciación. A continuación, se presentan las gráficas obtenidas durante el análisis (Figura 9A y B) y una tabla con los valores del RIN para cada muestra (Tabla 4).

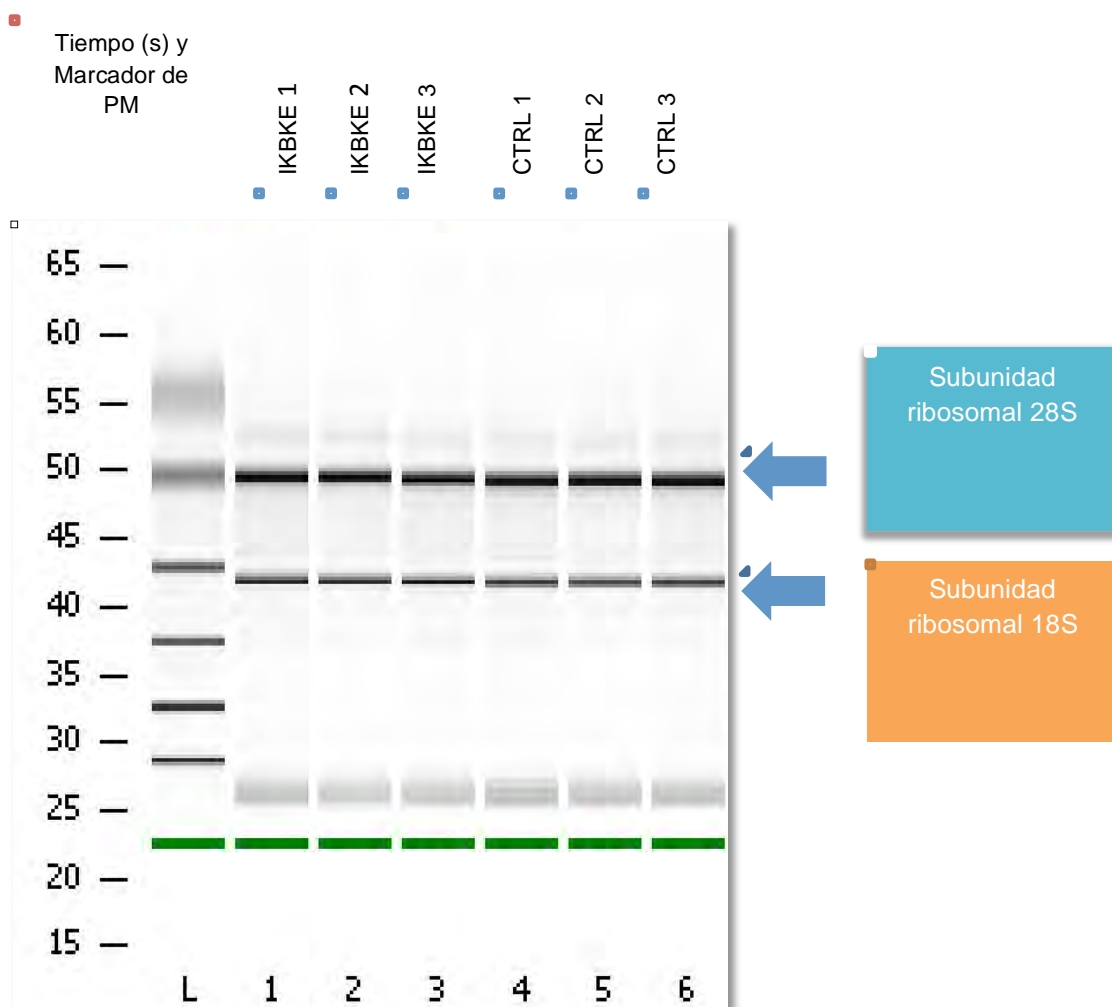


Figura 9. Electroforesis de los extractos de RNA. En la imagen se representa la corrida electroforética de las muestras de RNA. Del lado izquierdo de la gráfica se presenta el peso molecular que sirve de guía para visualizar los fragmentos de RNA según su posición en el gel y la intensidad luminínica de cada banda. Las bandas señaladas corresponden a los RNAs 28S y 18S. Las muestras aparecen en el siguiente orden de izquierda a derecha, las muestras transfectadas con el plásmido pIKBKE: IKBKE 1, 2 y 3 y, las muestras transfectadas con el plásmido control: CONTROL 1, 2 y 3.

A) Gráficas de electroforesis de las muestras transfectadas con el plásmido pIKBKE

B) Gráficas de electroforesis de las muestras transfectadas con el plásmido control

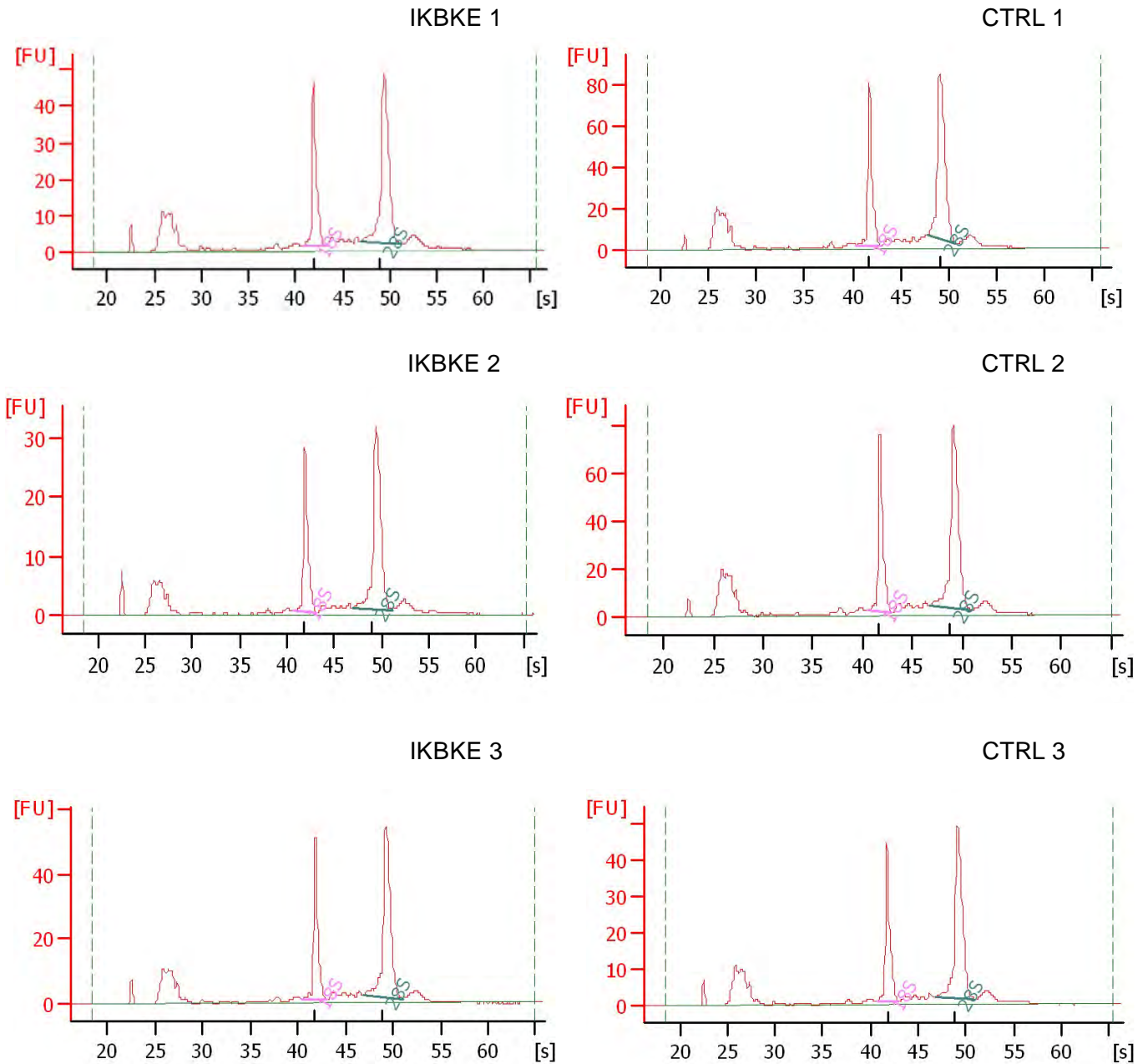


Figura 10. Electroferogramas de las muestras IKBKE vs control. Se muestran graficadas las corridas electroforéticas de A) las muestras transfectadas con el plásmido pIKBKE (muestras IKBKE 1, 2 y 3) y B) muestras transfectadas con el plásmido control (Control 1, 2 y 3). Los picos más grandes corresponden a los RNA ribosomales 18S y 28S; el tiempo (s) de la corrida electroforética en el eje horizontal y la intensidad lumínica de las muestras [FU] en el eje de las ordenadas.

Tabla 4. Asociación de RIN* a las muestras de estudio

Muestra	Número de Integridad de RNA (RIN)
IKBKE 1	9.3
IKBKE 2	9.7
IKBKE 3	9.4
Control 1	9.4
Control 2	9.4
Control 3	9.7

*El Número de Integridad de RNA (RIN) de cada muestra supera los nueve puntos para cada condición experimental.

4. CONTROL DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN.

Antes de analizar la expresión diferencial de las células MCF-7 por la sobreexpresión de IKBKE, fue necesario revisar la calidad del RNA tras su secuenciación. En cuanto a su calidad y paratenso, todas las muestras se agruparon según el vector con el que fueron transfectadas (gráfica del análisis de componentes principales, Figura 11). Las lecturas (en inglés *reads*) obtenidas fueron comparadas con bases de datos de genomas de varios organismos. Ninguna secuencia presenta contaminación con *E-Coli*, micoplasma, ni RNA ribosomal; y se demostró que la mayoría de los productos obtenidos son secuencias del genoma humano (Figura 12).

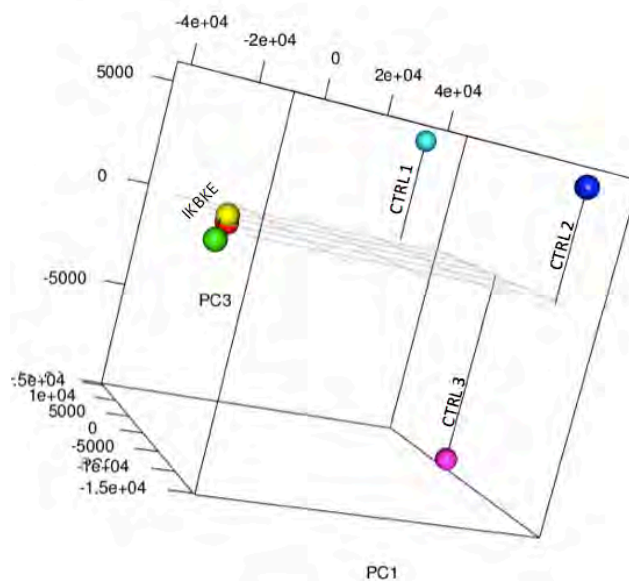


Figura 11. Gráfica del Análisis de Componentes Principales (PCA). La agrupación de las muestras IKBKE 1, 2 y 3 representadas con los colores rojo, amarillo y verde respectivamente, es más estrecha que la del grupo control 1, 2 y 3 con los colores cian, azul y rosa respectivamente. Las muestras IKBKE forman un conjunto en el mismo plano separadas de los controles principalmente por el componente principal 1 (PC1)

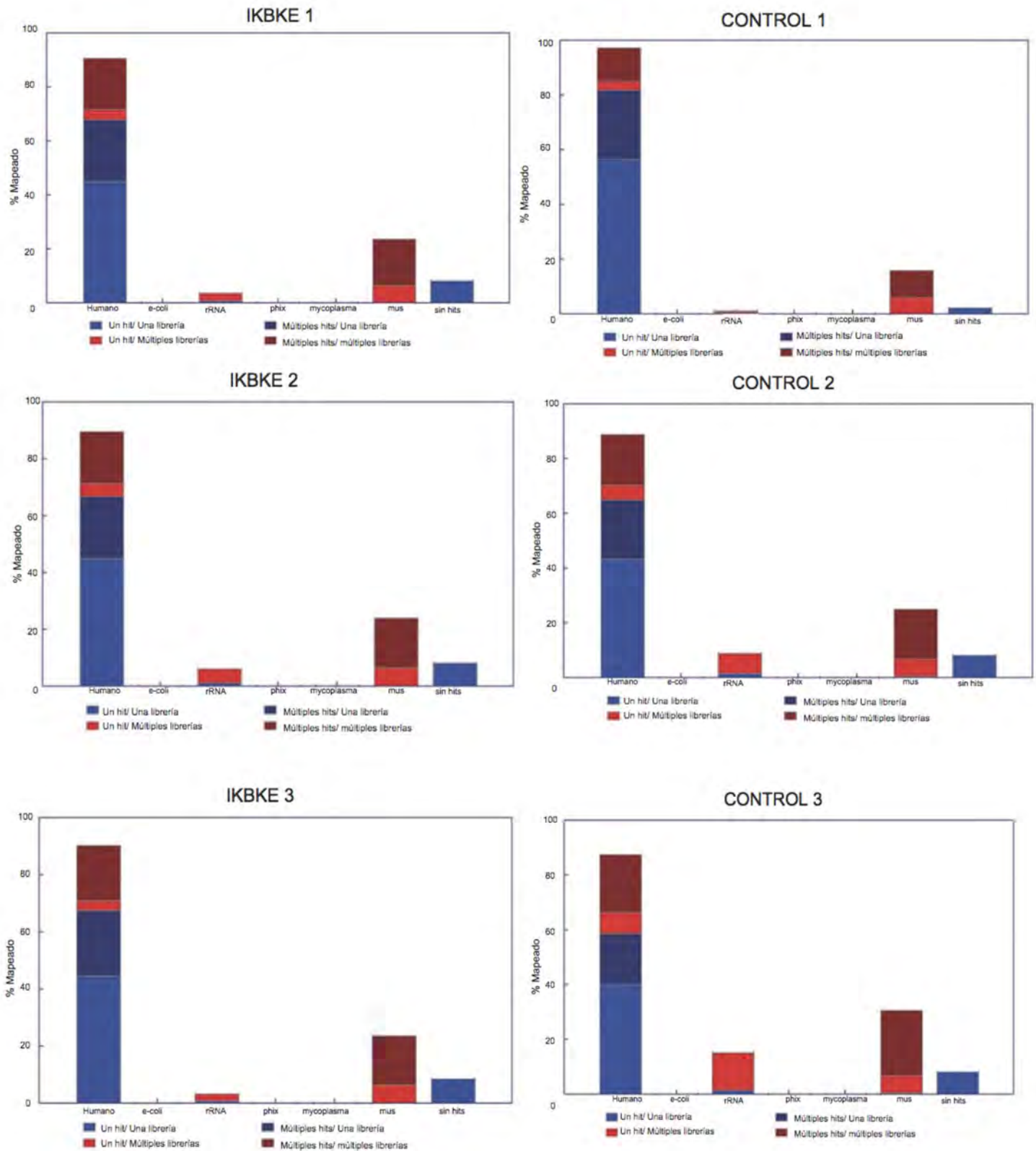


Figura 12. Control de calidad de las muestras secuenciadas. La mayor parte de los transcritos secuenciados pertenecen a RNA humano. Las muestras no están contaminadas con transcritos de origen bacteriano ni fúngico y por homología de genes ortólogos empata parcialmente con la biblioteca de ratón (mus). La cantidad de rRNA es óptima para el análisis de los datos.

5. EXPRESIÓN DIFERENCIAL ANTE LA SOBREENPRESIÓN DE IKBKE.

Después de corroborar que la calidad de las muestras secuenciadas es la adecuada, se procedió a un análisis computacional del transcriptoma. A escala global, las muestras que fueron transfectadas con el plásmido pIKBKE presentan un transcriptoma distinto al de las muestras transfectadas con el plásmido control. En total se consideraron 858 transcritos cuyo valor de FC (expresión relativa) fue mayor a 1.1 (Figura 13). Tal y como se observa en el mapa de calor en la figura 14, la expresión diferencial entre el grupo de los controles y el grupo de las muestras que sobreexpresan IKBKE está denotada por el aumento o disminución de distintos transcritos. En el mapa se enlistan sólo los genes alterados ante la sobreexpresión de IKBKE. En la figura 14 IKBKE se encuentra enmarcado en rojo y su nivel de expresión aparece aumentado en las muestras A, B y C (transfectadas con pIKBKE) y disminuidos en D, E y F (transfectadas con el plásmido control).

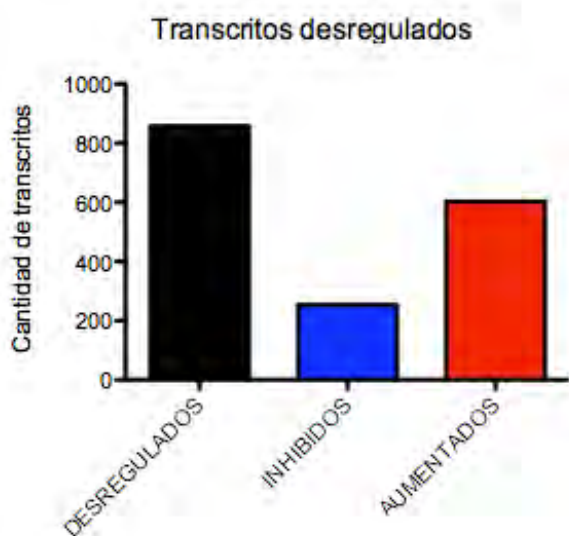


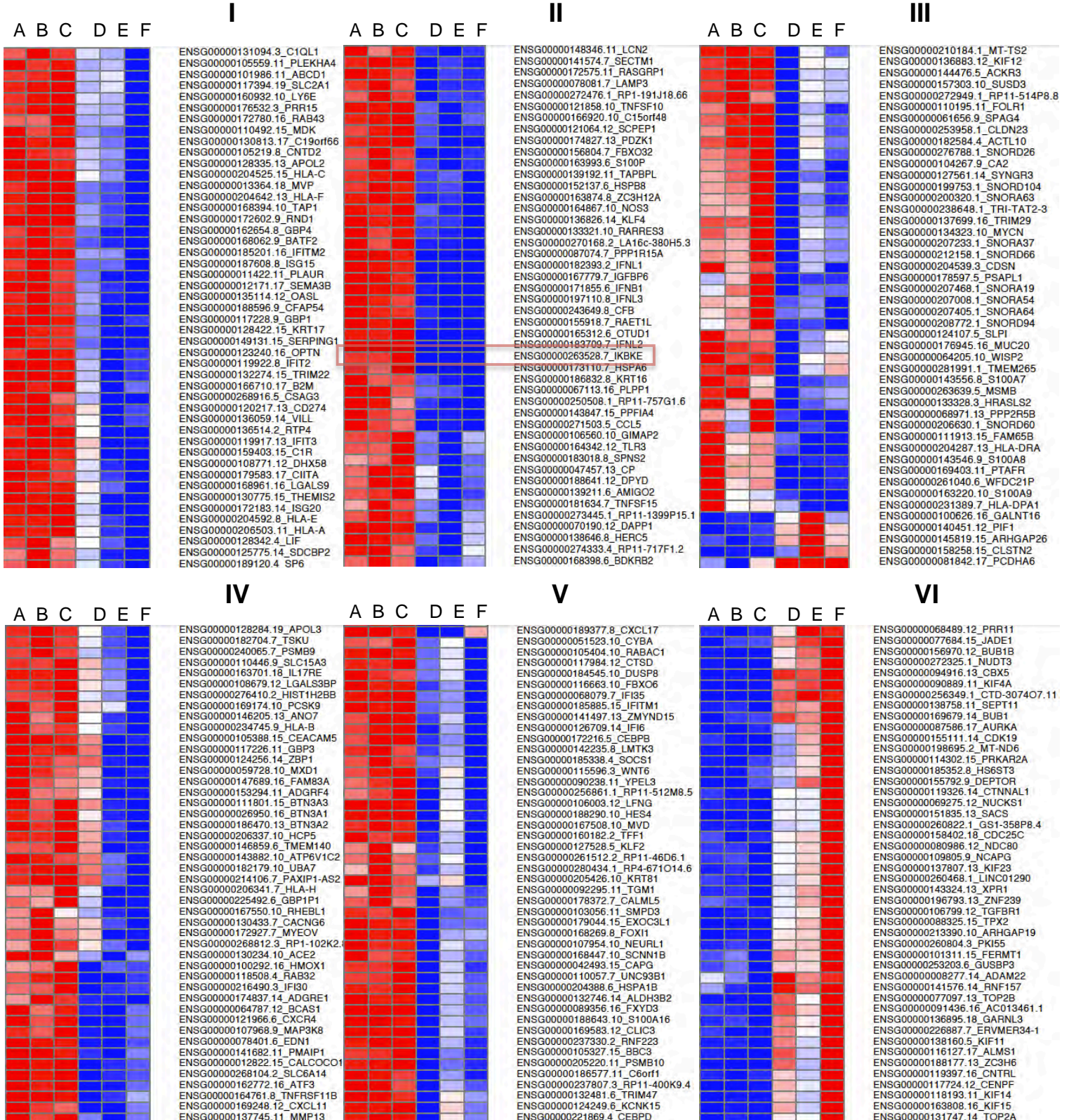
Figura 13. Gráfica del transcriptoma alterado ante la sobreexpresión de IKBKE. El total de transcritos desregulados con un FC (*fold change*) mayor a 1.1 fue de 858 (barra en negro), de los cuales 603 (barra en rojo) corresponde a los transcritos que aumentaron, mientras que el resto (barra en azul) fueron inhibidos. Nótese que el FC de 70% de los transcritos fueron aumentados.

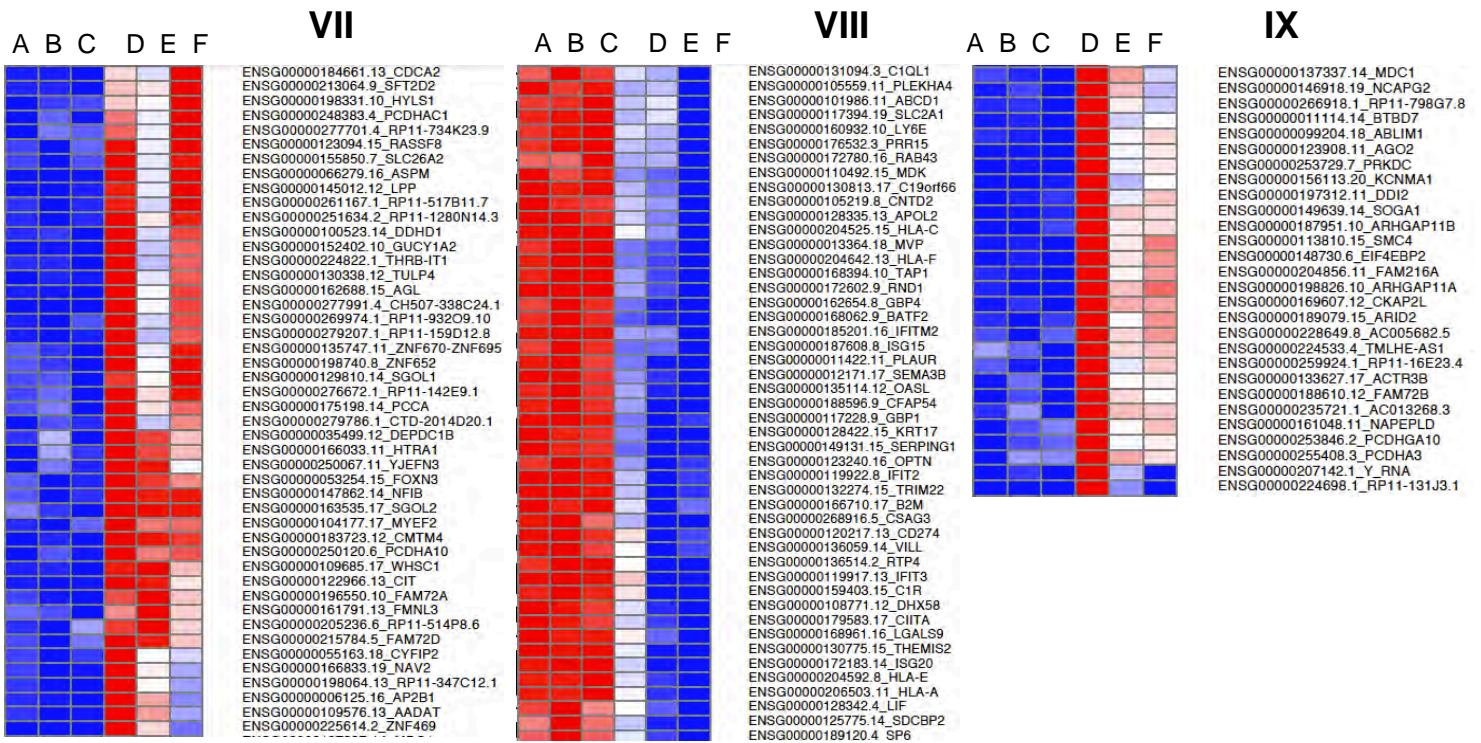
BARRA DE REFERENCIA



ORDEN DE LAS MUESTRAS SEGÚN SU POSICIÓN EN EL MAPA

A B C D E F
 IKBKE 1 IKBKE 2 IKBKE 3 CONTROL 1 CONTROL 2 CONTROL 3





MAPA DE CALOR EN MINIATURA

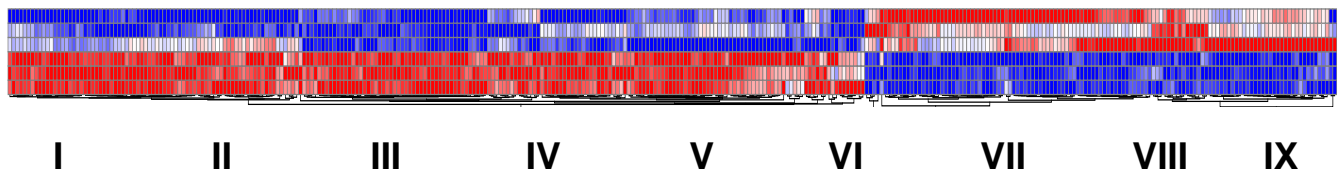


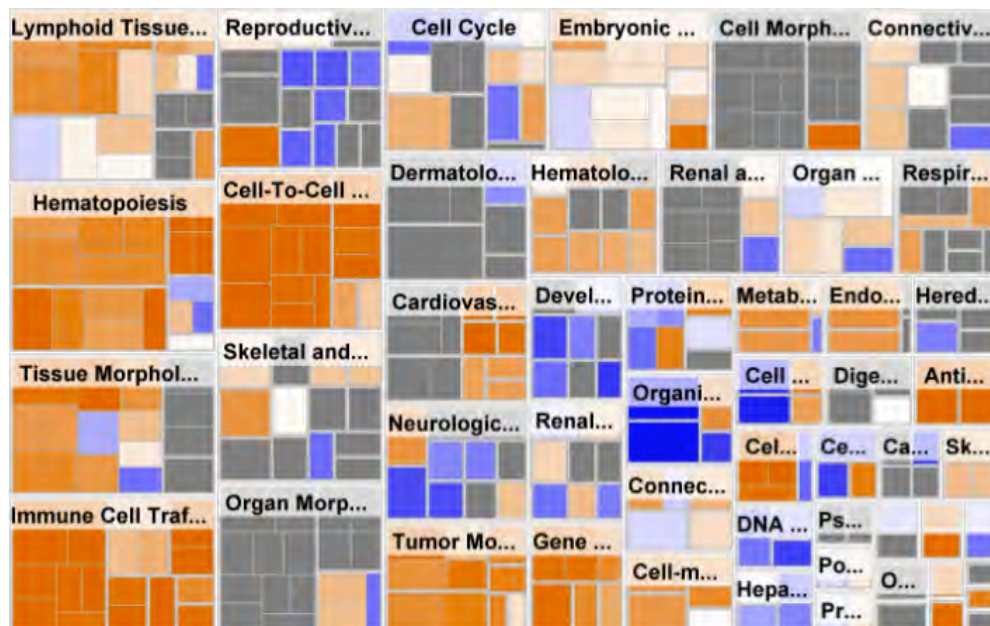
Figura 14. Mapa de calor representando el cambio en el perfil transcripcional de la línea celular MCF-7 ante la sobreexpresión de IKBKE. *Heatmap* de los transcritos cuya abundancia se modificó ante la sobreexpresión de IKBKE en la línea celular MCF-7. En cada imagen se enlistan los genes cuya expresión fue alterada ante la sobreexpresión de IKBKE. Las primeras tres muestras del lado izquierdo de cada imagen representan al grupo de muestras que sobreexpresan IKBKE mientras que las muestras restantes de la derecha corresponden al control. La barra de colores indica la expresión relativa de cada gen, tal que el color azul representa una baja expresión de los genes mientras que el color rojo representa el aumento en la expresión de los mismos con respecto al experimento control.

6. LA SOBREEXPRESIÓN DE IKBKE ALTERÓ LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN DIVERSOS PROCESOS BIOLÓGICOS

Para interpretar los resultados de un experimento de secuenciación de nueva generación tal y como es el RNA-seq se utilizan diversos programas bioinformáticos que proporcionan las herramientas necesarias para agrupar y dar significado a la gran cantidad de datos obtenidos tras el experimento. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) es un programa que permite integrar los resultados de la secuenciación en diversos contextos biológicos como son las vías de señalización, procesos biológicos, funciones y mecanismos alterados en un estudio de expresión génica.

El programa considera datos estadísticamente relevantes de la expresión de diversos genes para agruparlos según su participación en distintos procesos biológicos. Según su estado de activación, cada proceso presenta una coloración distinta: i) en tonos naranjas se representan los procesos biológicos específicos que probablemente se hayan activado ante la sobreexpresión de IKBKE; ii) los tonos azules indican la inhibición de estos; iii) los tonos grises y blancos representan aquellos procesos cuyos elementos se presentan desregulados, pero la tendencia de la actividad se desconoce.

Cada cuadrante representa específicamente un proceso biológico y su tamaño es correspondiente al valor estadístico p . Cada conjunto de procesos específicos corresponden a un proceso biológico general (categoría). Entre las categorías más destacadas se encuentran las siguientes: cáncer, muerte y supervivencia celular, desarrollo y función del sistema hematopoyético, respuesta inflamatoria, desarrollo celular y tisular, crecimiento y proliferación celular, etc. (Figura 15).



Continuación de la figura...

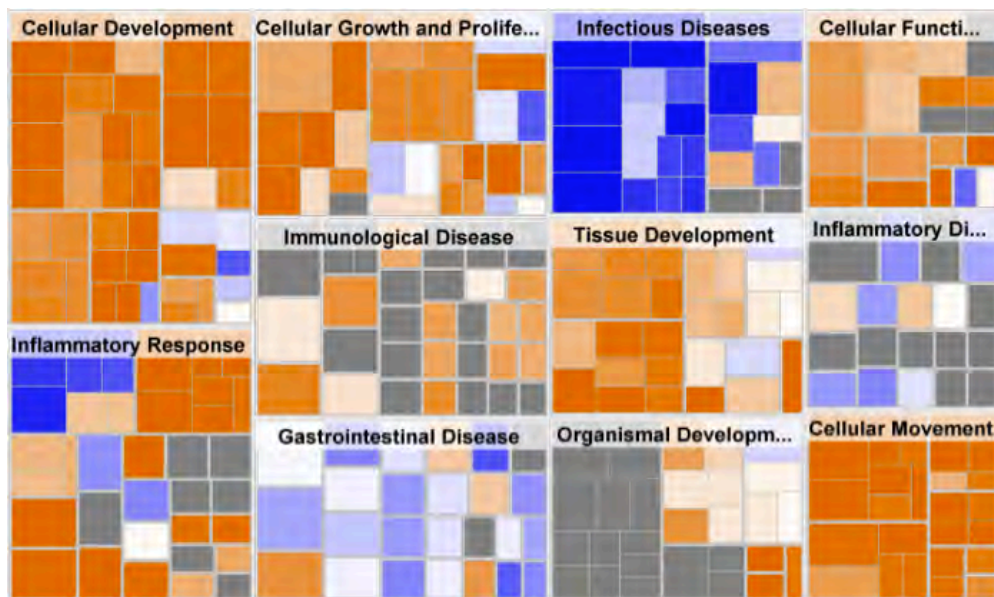
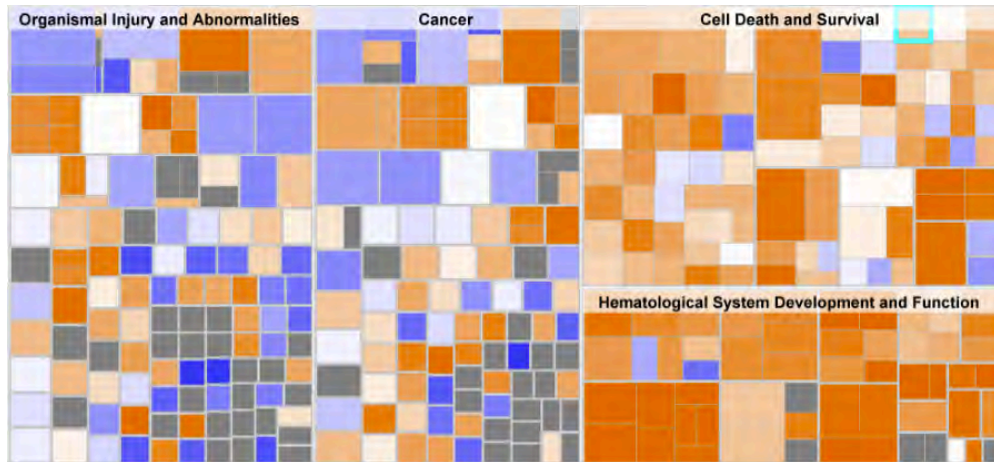
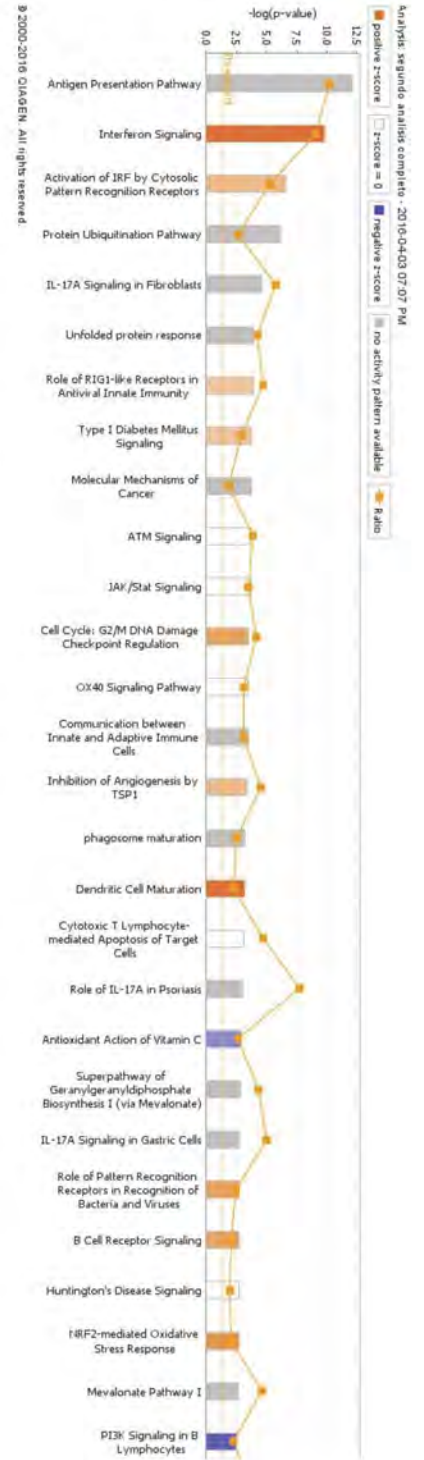
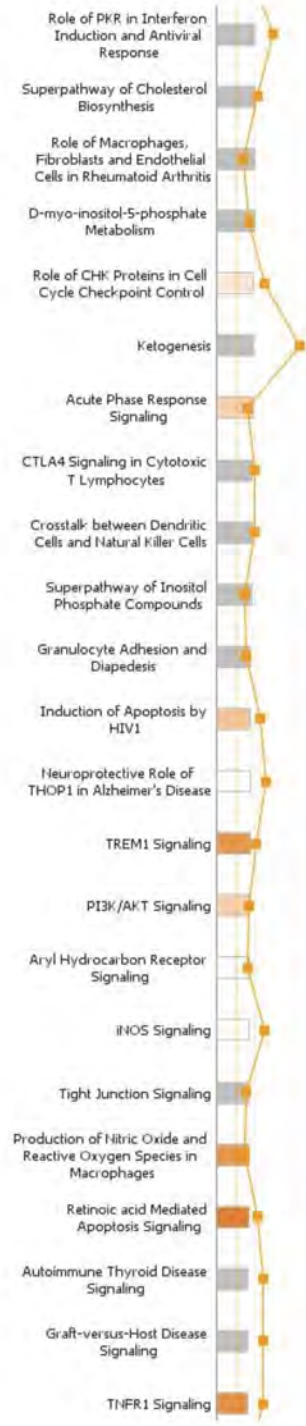
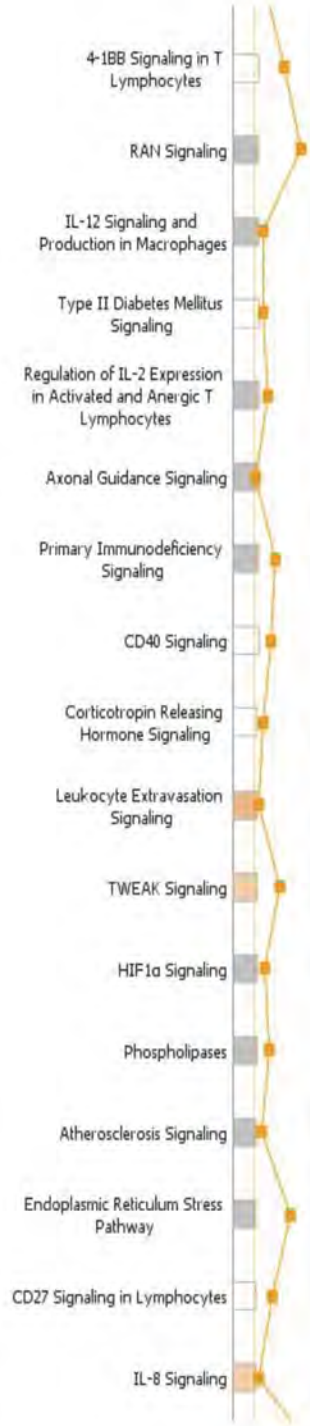
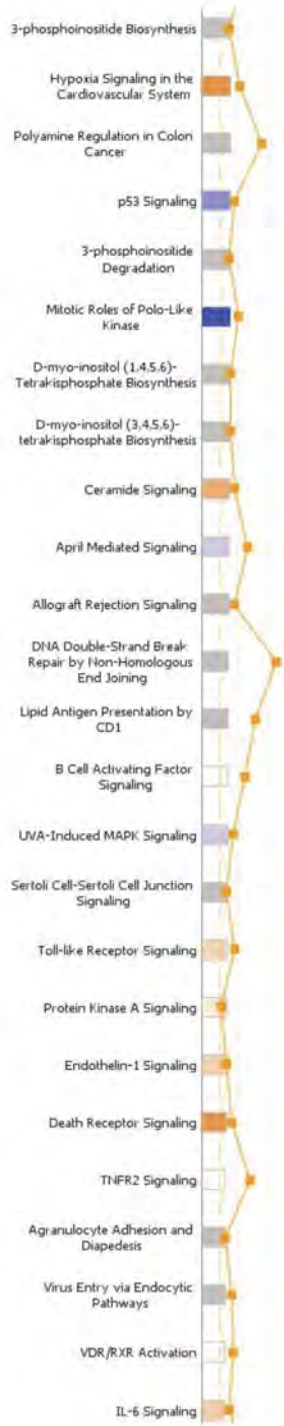


Figura 15. Mapa de procesos alterados. Se muestran los distintos procesos biológicos alterados ante la sobreexpresión de IKBKE. Se muestran las categorías: cáncer, desarrollo tisular, movimiento celular, respuesta inflamatoria, ciclo celular, entre otros. En cada categoría se muestran cuadrantes de diferentes tamaños con diferente estado de activación.



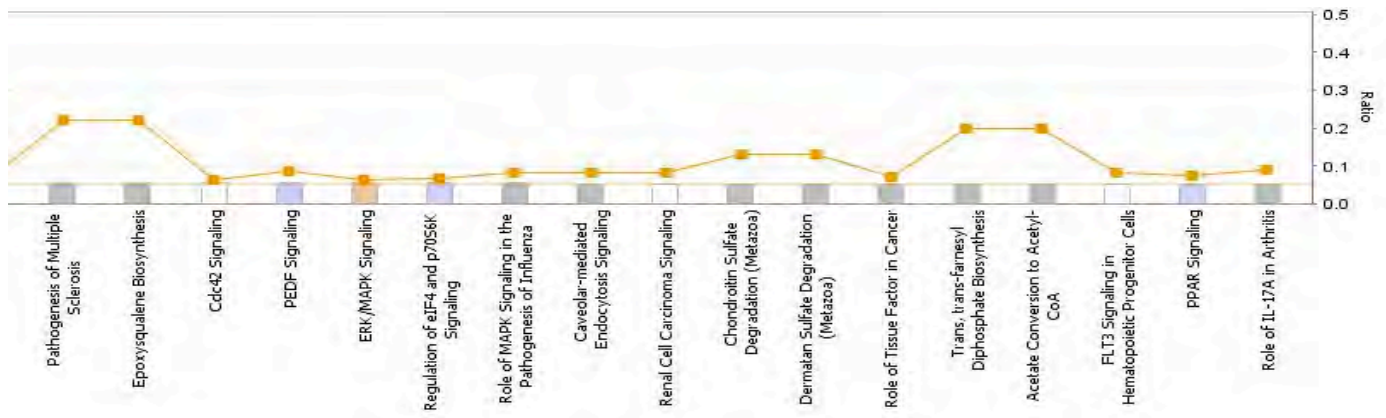
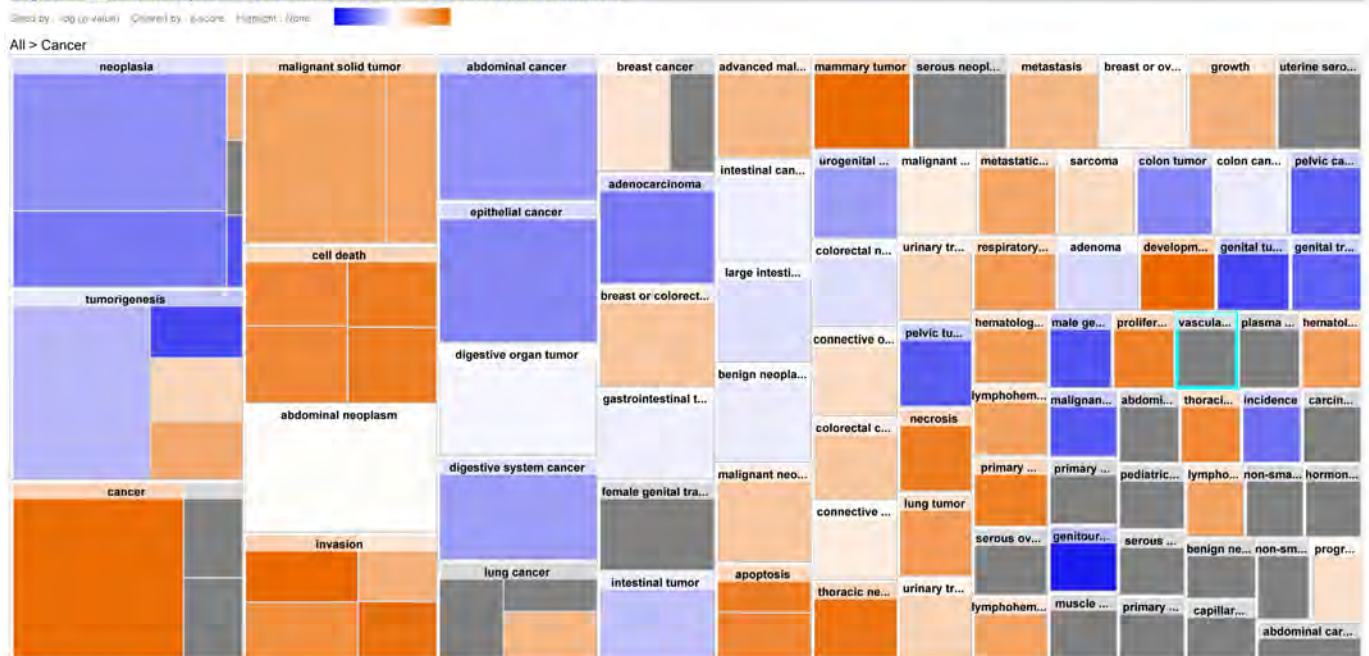


Figura 16. Gráfica representativa de las vías canónicas alteradas ante la sobreexpresión de IKBKE. El programa bioinformático IPA reconoce los cambios en la expresión diferencial y asocia sus productos a vías canónicas; en el presente histograma las vías canónicas son representadas mediante barras cuya longitud depende de la significancia obtenida tras la aplicación de pruebas estadísticas a los genes implicados. Entre las barras que presentan mayor relevancia estadística, ubicadas al inicio de la gráfica, se encuentran las que representan a las vías siguientes: vía de presentación de antígeno, señalización por interferones, activación de IRF, vía de ubiquitinación de proteínas, entre otras. Las vías canónicas que están asociadas en algún proceso de carcinogénesis y a su vez activadas son: regulación de la progresión del ciclo celular en fase G2/M, apoptosis mediada por ácido retinoico, hipoxia, señalización de ceramidas, señalización de la proteína cinasa A, señalización de MAP cinasas, señalización por Endotelina-1 y la vía de extravasación de leucocitos.

segundo analisis completo - 2016-04-19 11:24 AM - Diseases & Functions



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 17. Mapa de procesos asociados a cáncer. Se muestra la agrupación de diferentes procesos biológicos que podrían estar alterados ante la sobreexpresión de IKBKE. Entre las categorías relevantes se encuentran: cáncer epitelial, cáncer de mama, tumorigénesis, adenoma, invasión y metástasis.

7. LA SOBREENPRESIÓN DE IKBKE ALTERÓ LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA CARCINOGENÉISIS

Entre los distintos procesos desregulados (Figura 15), se encuentran algunos asociados directamente con la carcinogénesis (Figura 17). Ante la sobreexpresión de IKBKE se agruparon una serie de eventos relacionados con el desarrollo tumoral como: proliferación y crecimiento celular, señalización intercelular, movimiento y migración celular, invasión, evasión de la apoptosis, angiogénesis, entre otros.

Para determinar los mecanismos por medio de los cuáles IKBKE podría funcionar como un oncogén, se analizó cada proceso alterado que a su vez estuviera asociado con cáncer. Las figuras 17-22 muestran algunas agrupaciones que se observaron en el análisis. Todos los mapas representan procesos generales (categorías) y procesos específicos (cuadrantes) que son alteradas tanto positiva como negativamente ante la sobreexpresión.

Aunque no todos los genes cumplen el patrón de expresión esperado para cada proceso biológico, algunos cuadrantes representan un *valor-z* (valor de activación) relevante; en estos casos los patrones de expresión siguen un modelo esperado. Es decir, si una vía se encuentra activa, presenta activos a sus elementos regulatorios, mientras que una vía apagada presenta una baja en la expresión en sus elementos regulatorios. Entre más consistentes sean los valores obtenidos con los valores esperados, los últimos proporcionados por la base de datos del programa, el valor-z es más robusto. Por ejemplo, en la figura 17 se representa la categoría «cáncer», dentro de ella se observan agrupaciones de procesos biológicos característicos del cáncer. Cada proceso biológico a su vez está compuesto por cuadrantes que representan vías de señalización o procesos biológicos específicos que probablemente estén alterados por el efecto de la sobreexpresión del oncogén IKBKE.

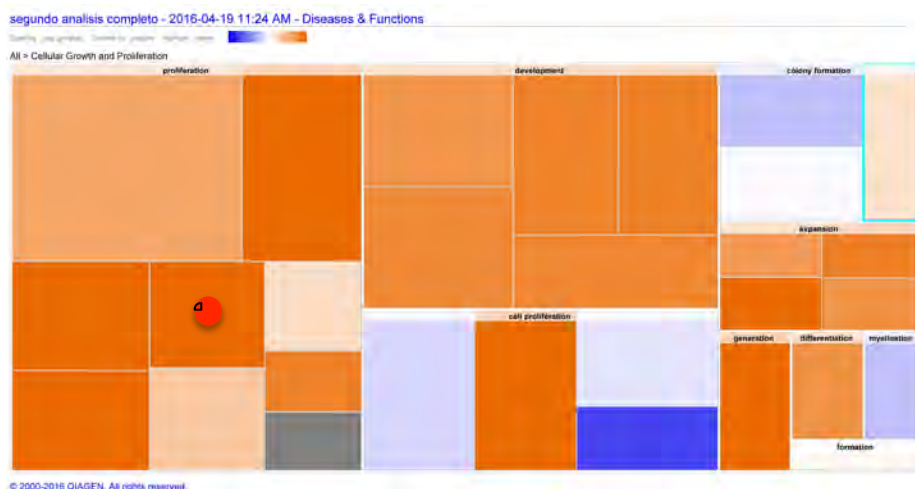


Figura 18. Activación de proliferación y crecimiento celular. En el mapa se ilustran los procesos alterados ante la sobreexpresión de IKBKE relacionados con un fenotipo proliferativo. Se muestran agrupaciones de genes que pueden estar relacionadas con la activación de vías involucradas en el crecimiento y la proliferación celular. El proceso específico de proliferación de células tumorales está marcada con rojo.



Figura 19. Agrupación de vías asociadas a la motilidad celular. En el mapa se ilustran los procesos alterados ante la sobreexpresión de IKBKE que son asociados con el movimiento celular. Los procesos son: movimiento celular, migración, invasión, reclutamiento, infiltración celular, diseminación y transmigración.

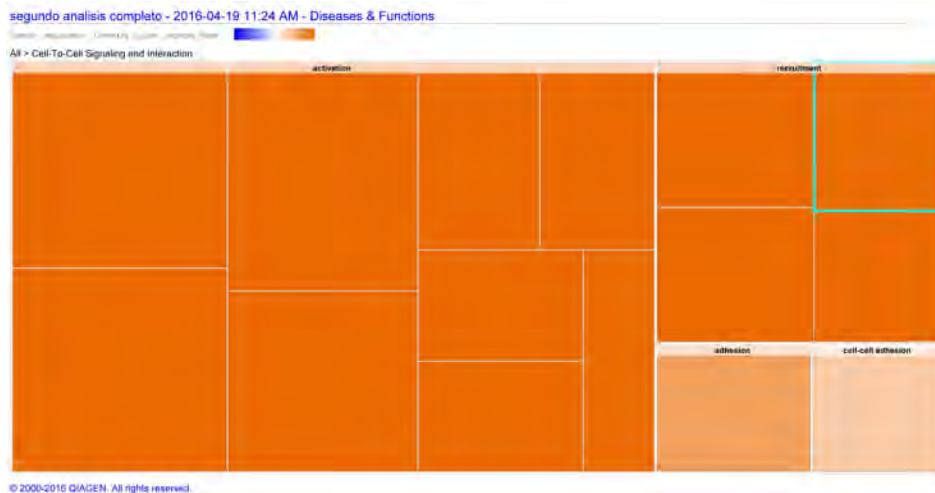


Figura 20. Agrupación de vías asociadas con señalización e interacciones célula-célula. Al igual que en la figura anterior, todos los cuadrantes de esta categoría presentan genes que en su mayoría aumentan su expresión ante la sobreexpresión de IKBKE. Los procesos observados son: Activación, reclutamiento, adhesión y adhesión célula-célula.



Figura 21. Agrupación de vías asociadas con la invasión. En esta categoría se presentan cuadrantes que presentan un gran número de genes activados en procesos involucrados en la invasión de celular, invasión de células tumorales, invasión por líneas celulares de cáncer.

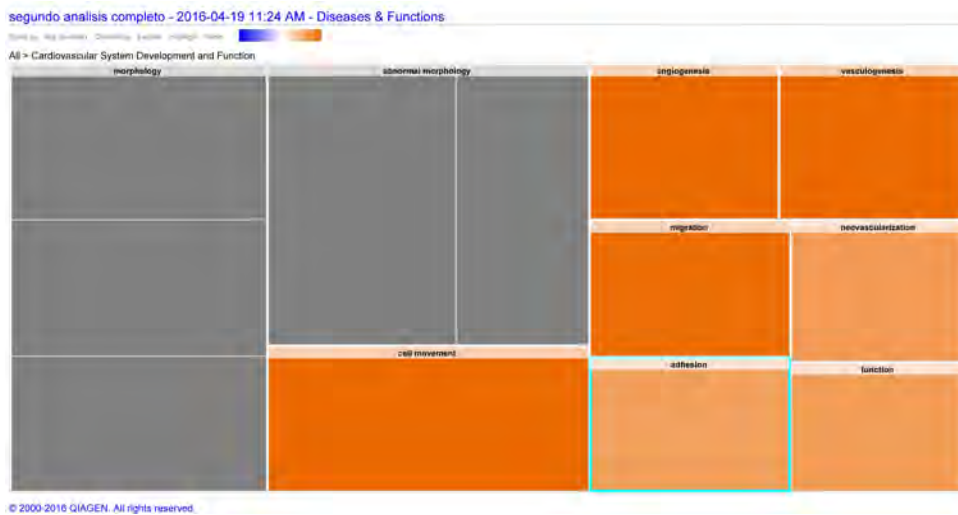


Figura 22. Agrupación de vías asociadas con el desarrollo y la función del sistema cardiovascular. Se muestran procesos asociados a esta categoría, entre ellos los que parecen estar involucrados en la carcinogénesis son: migración y movimiento celular, adhesión, función celular, neovascularización, angiogénesis, vasculogénesis.

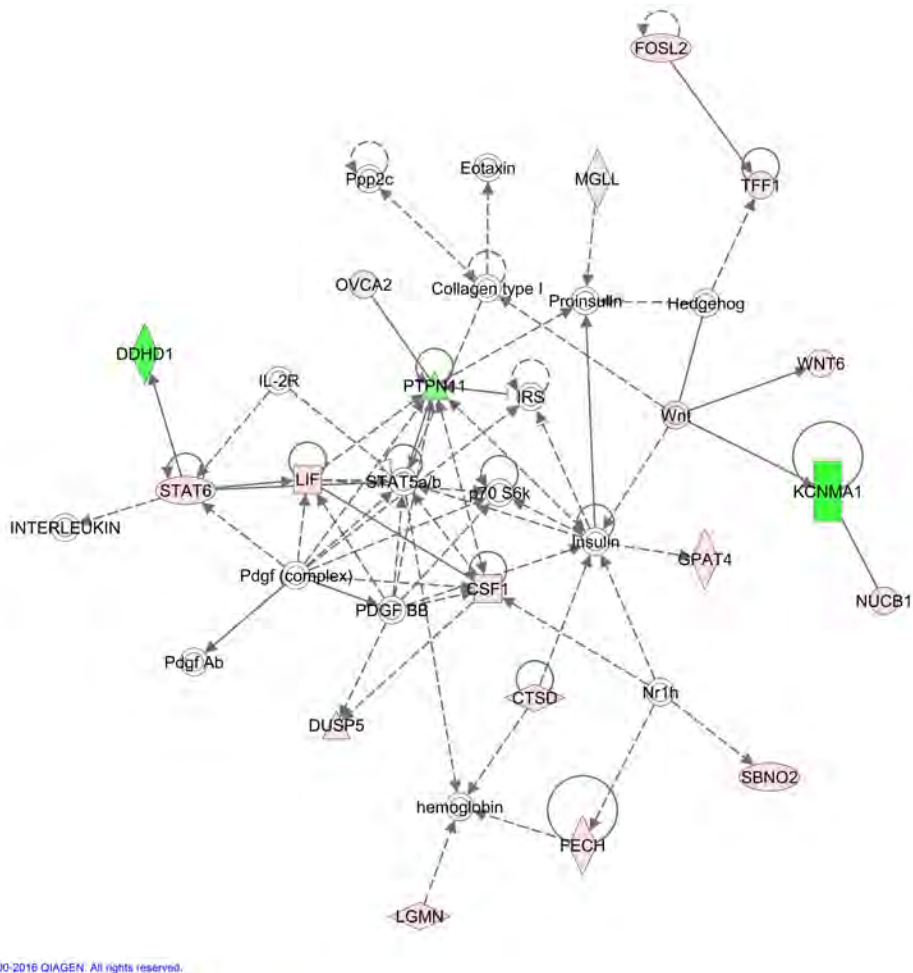


Figura 23. Vía implicada en el fenotipo troncal. La imagen representa una vía propuesta por IPA que se altera de manera significativa ante la sobreexpresión de IKBKE. En la vía se presentan diversos elementos que atribuyen al mantenimiento del fenotipo troncal, entre ellos LIF, STAT5 y 6 así como Hedgehog y Wnt. Las moléculas que aumentaron se representan en rojo, las moléculas inhibidas en verde. Las líneas punteadas representan posibles interacciones mientras que las líneas continuas representan una interacción establecida.

El programa agrupó procesos biológicos como: invasión, cáncer colorrectal, cáncer de mama, muerte celular, migración, adenocarcinoma, cáncer epitelial, neoplasia, entre otros en la categoría de «cáncer» (Figura 17). Cada proceso contiene diferentes cuadrantes representando un proceso o vía específicos. Por ejemplo, la categoría de «invasión» presenta cuadrantes de tonalidad naranja indicando un valor-z positivo, lo cuál está asociado con un proceso activo. Por el contrario, el proceso denotado como «cáncer epitelial» se compone de un cuadrante de tonalidad azul, indicando un menor número de transcritos asociados a este proceso comparado con el control. En conclusión, se puede ver que diversos procesos asociados a cáncer son alterados ante la sobreexpresión del oncogén IKBKE.

El cáncer evoluciona conforme adquiere características ventajosas que le permiten desarrollarse e invadir otros tejidos. Para conocer más a fondo los efectos del oncogén IKBKE en la carcinogénesis, se revisaron los procesos biológicos que se presentan con mayor frecuencia en tumores sólidos (Figuras 18-22). Algunas características que se observan en los *hallmarks* del cáncer, fueron identificadas en las agrupaciones propuestas por el programa IPA.

En la figura 18 se muestra la categoría de «proliferación y crecimiento celular», todos los cuadrantes de la agrupación de «proliferación» se presentan en tonos naranjas evidenciando que, según los patrones de expresión presentados, las vías que conforman estos procesos se encuentran activadas. A excepción de un cuadrante que se presenta en gris [-log(p-value) 4.175 : z-score indeterminado], los cuadrantes restantes tienen un valor-z determinado. Estos datos sugieren que IKBKE regula procesos asociados con la proliferación celular.

En cuanto al proceso de «motilidad celular», una de las características más importantes para la transición epitelio-mesénquima, la invasión y metastasis; se muestran varios procesos desregulados (Figura 19). La tonalidad naranja de todos los cuadrantes que componen a los procesos de esta categoría indica que los procesos específicos tienen un valor-z positivo. Por tanto, podemos especular que los procesos presentes en esta categoría: movimiento celular, migración, invasión, infiltración celular, diseminación, transmigración y reclutamiento se encuentran activos ante la sobreexpresión de IKBKE.

Genes implicados en el proceso de adhesión de células endoteliales son importantes en la carcinogénesis dado su papel en la intravasación y extravasación de células cancerosas. Procesos que tienen que ver con la comunicación intercelular, incluyendo el proceso de adhesión célula-célula se representan en la figura 20.

La invasión es una de las características más importantes del cáncer. La diferencia entre un tumor benigno y uno maligno radica en que este último tiene la capacidad de invadir tejidos adyacentes (invasión) y alrededores formando tumores secundarios (metástasis). En la figura 21 se muestran cuatro procesos relacionados con la invasión y los estadísticamente más relevantes son los de «invasión celular» e «invasión de líneas celulares tumorales».

En conclusión, mediante la búsqueda de procesos generales y específicos alterados y a su vez asociados al proceso de carcinogénesis en el programa bioinformático IPA, se encontraron varios que están relacionados con algunos *hallmarks* del cáncer. Por ejemplo: crecimiento y proliferación celular, motilidad y migración celular, cambios en las moléculas de adhesión, transmigración, angiogénesis y desarrollo.

8. IKBKE Y EL FENOTIPO TRONCAL EN CÁNCER

Debido a la importancia que tienen las CSC en la tumorigénesis y la recurrencia tumoral, se decidió buscar procesos que podrían estar implicados en el mantenimiento del fenotipo troncal. En la figura 16 se observaron alterados diferentes procesos que tienen que ver con el desarrollo embrionario y el desarrollo tisular. Por otro lado, dentro del análisis se presentan veinticinco vías de señalización cuya alteración es estadísticamente significativa. Entre ellas, once tienen que ver con desarrollo. Una de tales vías presenta sobreexpresado a LIF (Figura 23), una citocina capaz de activar las vías JAK/STAT, MAPK/ERK y PI3K/AKT (vías implicadas en la regulación de respuestas biológicas en células troncales embrionarias). En la figura 23 se presenta la vía que sobreexpresa LIF. Nótese que uno de los componentes de la vía es Hedgehog, una glicoproteína que tiene la capacidad de recapitular la expresión génica que hay en las células troncales embrionarias. Además, en esta misma vía se presenta Wnt activado, una proteína importante para el mantenimiento del fenotipo troncal.

9. VALIDACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN

En la tabla 5 se presentan genes relevantes en procesos tanto asociados a *hallmarks* como al desarrollo y el fenotipo troncal. Para validar los cambios en la expresión génica observados en la secuenciación, se midió por qPCR la expresión relativa (FC) de 5 genes involucrados en procesos de desarrollo y fenotipo troncal: S100A6, LIF, CCL5, CXCR4 y CXCL17. La tendencia con la que aumenta la expresión de estos genes es equiparable entre ambos métodos (Figura 24). Los genes S100A7 y CCL5 fueron los que tuvieron un cambio más drástico ante la expresión forzada de IKBKE.

Tabla 5. Top genes desregulados*

DESARROLLO/FENOTIPO TRONCAL		CRECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN		INVASIÓN Y METÁSTASIS	
GEN	FC	GEN	FC	GEN	FC
CCL5	7.663	S100A9	6.979	IGFBP6	16.003
S100A7	6.974	LCN2	5.154	KLF4	2.430
CXCR4	4.397	PLAUR	4.114	ATF3	2.385
NOS3	2.357	MYCN	2.952	EDN1	2.711
CXCL17	2.108	TRIM22	2.857	HMOX1	2.043
LIF	1.910	CXCL11	3.915	CD47	1.441

*Selección de genes por procesos asociados al mantenimiento del fenotipo troncal y de *hallmarks*

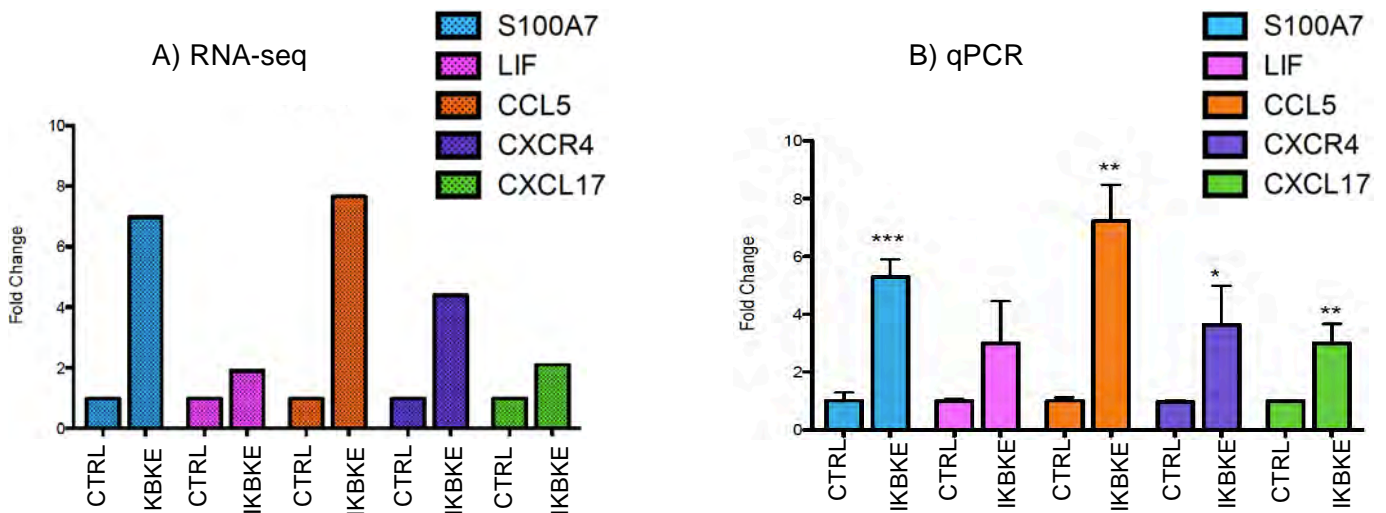


Figura 24. Validación de los datos de la secuenciación. En la figura se muestran los valores de la expresión relativa de 5 genes asociados al desarrollo y al fenotipo troncal de A) los resultados del RNA-seq y B) los resultados obtenidos de la qPCR.

VII DISCUSIÓN

La expresión forzada de IKBKE en la línea celular MCF-7 alteró la expresión de cientos de genes, varios de ellos relacionados con procesos carcinogénicos. A grandes rasgos, estos procesos se pueden dividir en dos grupos: i) procesos asociados a *hallmarks* y ii) procesos asociados con la adquisición y/o el mantenimiento de un fenotipo troncal. A continuación se discute la activación de estos dos grupos de procesos.

1. ACTIVACIÓN DE HALLMARKS

Los procesos asociados con los *hallmarks* son aquellos que se engloban en las características distintivas del cáncer. En este estudio se observó la activación de procesos como proliferación, crecimiento, angiogénesis, invasión y metástasis, lo cual sugiere que la cinasa IKBKE induce de manera directa o indirecta la transcripción de genes relacionados con estos procesos carcinogénicos.

El dogma central de la biología molecular propone que el flujo de información genética parte desde el DNA hacia un producto (RNA o proteína). Por lo tanto, los cambios en el fenotipo celular son producto de cambios en la expresión génica. La activación de ciertas vías de señalización da como resultado la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares. Algunos de los cuales pueden tener un efecto prooncogénico o antioncogénico y contribuir de manera antagónica durante el desarrollo neoplásico. Una de las vías canónicas que resultó alterada ante la sobreexpresión de IKBKE fue PI3K/Akt.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que la activación de la vía de PI3K/Akt es un paso esencial para la iniciación y la promoción de tumores [García-Echeverría y Sellers, 2008]. La señalización por PI3K/Akt/mTOR participa en múltiples procesos celulares como crecimiento, proliferación, motilidad, adhesión celular, progresión del ciclo celular, angiogénesis y evasión de la apoptosis [Manning y Cantley, 2007]. Esta vía de señalización se ha visto implicada en la resistencia endocrina en cáncer de mama; esto debido a que Akt puede activar al receptor de estrógenos (ER) independientemente de la presencia de estrógenos.

La expresión de IKBKE altera la actividad de varias vías de señalización, algunas de estas implicadas en la carcinogénesis [Paplomata et al, 2013]. En muestras de tumores de mama la expresión de IKBKE se relaciona con la hiperactivación de Akt. En líneas celulares transfectadas con IKBKE se demostró que Akt es un sustrato de esta cinasa. En este estudio, la activación de Akt independiente de PI3K promueve la transformación maligna en líneas celulares que sobreexpresan IKBKE [Guo et al, 2011].

La vía de PI3K/Akt interactúa con la vía de MAPK/ERK [Mendoza et al, 2011], vía que también es activada ante la sobreexpresión de IKBKE. La cascada de señalización por la vía MAPK/ERK se activa por medio de mitógenos que interactúan con el receptor transmembranal y como resultado se activa la transcripción de genes que promueven la división celular y la evasión de la apoptosis [Dhillon et al, 2007]. Estos procesos se asocian con las capacidades adquiridas del cáncer y se pueden considerar como prooncogénicos. Por sus efectos tumorigénicos, se considera que los componentes de la señalización de las MAPK pueden ser blancos terapéuticos prometedores [Santarpia et al, 2012]. La vía de MAPK/ERK se encuentra activada en varios tipos de cáncer de mama y participa en el desarrollo tumoral [Santen et al, 2002].

La sobreexpresión de IKBKE en líneas celulares de cáncer triple negativo contribuye a la activación de STAT3 y NF-kB [Barbie et al, 2014]. Ambos factores de transcripción se encuentran activados de manera constitutiva en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama [Banerjee y Resat 2016; Biswas et al, 2004]. Estos factores activan la transcripción de citocinas proinflamatorias CCL5 e IL-6. Ambas citocinas tienen un efecto protumorigénico en células endoteliales y en células de cáncer triple negativo al promover la proliferación y la migración [Barbie et al, 2014].

La activación de procesos relacionados con la obtención de un fenotipo invasivo y/o metastásico juegan un papel importante en la propagación tumoral. En los resultados se muestran activos varios de estos procesos (motilidad celular, cambios en polaridad y uniones celulares, cambios en moléculas de adhesión, invasión, etc.). Se ha demostrado que la actividad de las vías de PI3K/Akt, JAK/STAT y MAPK/ERK puede contribuir a la adquisición de un fenotipo invasivo y/o metastásico [Teng et al, 2008; Wallin et al, 2012].

La metástasis es la causa del 90% de las muertes por cáncer. La evasión de la apoptosis es una característica esencial no sólo durante el desarrollo del tumor primario sino también para el proceso de metástasis [Mehlen y Puisieux, 2006]. Los resultados obtenidos sugieren que la apoptosis está activa en las células que sobreexpresan IKK ϵ . Sin embargo, no hay evidencia de que las células MCF-7 entren en apoptosis ante la sobreexpresión de IKBKE. En algunos casos, la sobreexpresión de un oncogén puede ser insuficiente para la transformación celular debido a que en respuesta a esto las células entran en los programas de muerte celular y/o senescencia [Chandek y Mooi, 2010; Shortt y Johnstone, 2012; Wajapeyee, 2008] y la actividad de oncogenes antiapoptóticos es necesaria para el desarrollo tumoral [Shortt y Johnstone, 2012]. En estudios con líneas celulares de glioma la sobreexpresión ectópica de IKBKE contribuye a la resistencia a la apoptosis ante la exposición a rayos UV [Guan et al, 2011]. Este estudio evidencia la actividad antiapoptótica de IKBKE. Además, en este mismo estudio se vio que IKBKE tiene la capacidad de inducir la expresión de BCL-2 al activar la señalización por NF-kB [Guan et al, 2011].

En conclusión, varios estudios exponen a IKBKE como un blanco terapéutico para diferentes tipos de cáncer [Challa et al, 2016; Guo et al, 2013; Li et al, 2014; Verhelst et al, 2013;], incluyendo algunos subtipos de cáncer de mama [Barbie et al, 2014] por activar la vía de AKT y NF-kB [Challa et al, 2016; Li et al 2014]. En este trabajo, la secuenciación permitió distinguir diversos procesos carcinogénicos desregulados ante la sobreexpresión de IKBKE por diferentes mecanismos, principalmente la activación de vías que promueven la obtención de características adquiridas del cáncer como: PI3K/Akt, MAPK/ERK y JAK/STAT, entre otras.

2. PROPIEDADES TRONCALES

Aunque no hay evidencia que indique que IKBKE contribuye directamente a la desdiferenciación tumoral (del inglés, *tumor dedifferentiation*), IKK ϵ participa en la activación de factores transcripcionales que regulan la expresión de genes involucrados con el mantenimiento del fenotipo troncal. Por ejemplo, IKBKE permite la liberación y subsecuente translocación nuclear del factor transcripcional NF-kB. En estudios con células pluripotenciales inducidas, se ha demostrado que NF-kB regula el mantenimiento del fenotipo troncal [Takase et al, 2013]. Asimismo, en un modelo murino de cáncer de mama HER-2 positivo, IKK α (cinasa río arriba de NF-kB) promueve la autorrenovación en la población de células troncales de cáncer. Asimismo, en el subtipo basal de tumores triple negativos, NF-kB regula la población de CSC [Yamamoto et al, 2013]. Aunado a esto, en un modelo de progresión de cáncer de mama, NF-kB juega un papel en la EMT y la

metástasis [Huber et al, 2004]. El proceso de EMT se considera importante para la adquisición y el mantenimiento de propiedades troncales tanto en células normales como en cáncer [Liu y Fan, 2015].

Ante la sobreexpresión de IKBKE se activan procesos y vías relacionadas con la adquisición de un fenotipo troncal: transición epitelio-mesénquima, diferenciación, desarrollo tisular y embrionario, cambio en las moléculas de adhesión, regeneración tisular, entre otros. La activación de estos procesos puede atribuirse a la señalización aberrante de vías de señalización que mantienen el fenotipo troncal a causa de la sobreexpresión de IKBKE.

Además de la activación de procesos relacionados con el fenotipo troncal, en este estudio, la sobreexpresión de IKBKE tuvo como resultado la activación de ciertas vías de señalización que se consideran importantes para el mantenimiento del fenotipo troncal: JAK/STAT, PI3K/AKT, iNOS y p53. En cuanto a las vías responsables de la autorrenovación en células troncales, la señalización por el eje Notch, Hedgehog y Wnt juega un papel importante en el mantenimiento de células troncales normales y CSC [Takebe et al, 2015]. La sobreexpresión de IKBKE provocó un aumento en la expresión de LIF y de Wnt en una red establecida por el programa. La activación de vías de señalización relacionadas con el mantenimiento del fenotipo troncal indica que IKBKE es una cinasa que podría contribuir al mantenimiento de CSC de mama.

La vía de JAK/STAT regula el desarrollo embrionario y está involucrada en el control de ciertos procesos como el mantenimiento de células troncales, la hematopoyesis y la respuesta inflamatoria [Thomas et al, 2015]. Se ha demostrado que STAT3 se encuentra preferentemente activo en la población de CSC a diferencia del resto de las poblaciones celulares en cáncer. De hecho, en un estudio con tumores mamarios la vía de señalización de JAK/STAT se encontró preferentemente activada en células troncales (CD44+/CD24-). La inhibición de JAK2 resultó en la disminución de esta población celular y la pérdida de la capacidad de iniciar tumores en modelos de xenotransplantes murinos [Marotta et al, 2011]. En un estudio reciente se evaluó la activación de STAT3 en las poblaciones celulares de cáncer de mama que expresan ALDH1 y en concordancia con los resultados del estudio anterior, las células ALDH positivas presentaron mayores niveles de STAT activado [Lin et al, 2013].

La vía de PI3K/Akt se ha asociado con la resistencia a la radioterapia y a la expresión de marcadores de troncalidad en diferentes tipos de cáncer [Chang et al, 2013; Martelli et al, 2011]. Asimismo, en la población de CSC derivadas de líneas celulares de cáncer triple negativo se demostró que la inhibición de ciertos elementos de la vía Akt/mTOR provoca una reducción de la población troncal. Adicionalmente, se probó que la actividad de Akt promueve la activación de la división asimétrica en estas líneas celulares [Lai et al, 2016].

La presencia de lipopolisacáridos (LPS) en la pared celular de las bacterias Gram negativas puede desencadenar una respuesta inmune por medio de su interacción con el receptor de membrana TLR4. Este receptor activa varias vías de señalización relacionadas con la respuesta inflamatoria, entre ellas la señalización por IKBKE y TBK1. Sin embargo, la expresión de la enzima iNOS y la síntesis de óxido nítrico también pueden ser activadas por LPS [Lee et al, 2005]. La vía de la producción de óxido nítrico fue alterada ante la sobreexpresión de IKBKE.

En CSC de colon la expresión de iNOS y la alta producción de óxido nítrico está relacionada con varias propiedades, entre ellas el crecimiento tumoral, la troncalidad y la capacidad tumorigénica en esta población celular [Puglisi et al, 2015]. En estudios previos con CSC de glioma, se demostró que la alta concentración de

óxido nítrico y la expresión de iNOS promueve la proliferación y el crecimiento celular [Eyler et al, 2011]. En estudios con tumores de cáncer de mama triple negativo, se encontró que la expresión de iNOS se correlaciona con un peor pronóstico. Además, suprimir la actividad de la iNOS en modelos de cáncer de mama triple negativo reduce la proliferación, la autorrenovación de CSC, migración celular *in-vitro* y factores transcripcionales relacionados con la EMT [Granados-Principal et al, 2015].

La actividad de la vía de p53 se observó disminuida ante la expresión inducida de IKBKE. En células embrionarias de ratón, p53 se expresa pero se mantiene inactivo en el compartimento citoplasmático. La activación de p53 contribuye a la expresión de miR34-a que a su vez reprime la expresión de genes relacionados con la autorrenovación de células troncales Oct4 y Nanog [Loh et al, 2006]. Además, la actividad de p53 puede inhibir ciertos procesos como la EMT y la expresión de marcadores de superficie asociados a troncalidad como CD44 [Rivlin et al, 2015]. Por estas razones p53 se considera una barrera para la formación de CSC.

Por otro lado, p53 junto con ER α están involucrados en la regulación de *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) [Rivlin et al, 2015], un factor importante en el mantenimiento de células troncales hematopoyéticas y de mama, inhibición de la diferenciación de células troncales embrionarias y promueve la supervivencia y proliferación en ciertos tipos celulares incluyendo células de cáncer de mama [Escary et al, 1993; Li et al, 2014]. El aumento de LIF ante la sobreexpresión de IKBKE se mostró en la activación de una vía de señalización relacionada con el desarrollo. Uno de los elementos sobreexpresados en esta vía fue Wnt, una glicoproteína que tiene un papel crítico en el mantenimiento de células troncales embrionarias y cancerosas [Reya y Clevers, 2005]. Wnt puede regular directamente la actividad de Hedgehog, la cual promueve el mantenimiento de células troncales tanto en cáncer como en células troncales embrionarias y adultas [Cochrane et al, 2015].

En conclusión, la sobreexpresión de IKBKE tiene como consecuencia la activación de diversos procesos asociados al desarrollo tisular y embrionario. Dichos procesos podrían estar implicados en la adquisición y/o mantenimiento de un fenotipo troncal. La actividad de ciertas vías de señalización podría contribuir a la activación de estos procesos y explicar en parte un mecanismo por el cuál la actividad oncogénica de IKBKE se relaciona a la dediferenciación tumoral como un proceso de reprogramación celular.

VIII CONCLUSIÓN

La expresión diferencial inducida por la sobreexpresión de IKBKE de la línea celular MCF-7 fue analizada por medio del programa bioinformático IPA. En este estudio se demuestra que IKBKE es una cinasa capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de genes involucrados en procesos carcinogénicos y de mantenimiento troncal.

IX PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este proyecto se observó que la sobreexpresión de IKBKE tiene un impacto en la expresión génica a nivel de transcriptoma de la línea celular MCF-7. Una pregunta importante que se debe resolver en un futuro es si los cambios en los mRNAs también ocurren a nivel de proteína, esto se puede lograr comparando los niveles de proteína de las muestras control con las muestras transfectadas con IKBKE.

El siguiente paso es analizar los cambios en el fenotipo celular que pueden surgir a partir de los cambios en la expresión génica. Dado que se observaron activos procesos asociados a *hallmarks* se puede inferir mediante ensayos funcionales los cambios en el fenotipo. Por ejemplo, evaluar la tasa de proliferación celular entre las células control y células que sobreexpresan IKBKE. Usar otros ensayos para evaluar otros procesos: migración, invasión y metástasis.

En este proyecto también se encontró que el incremento de IKBKE a su vez aumenta transcritos relacionados con el desarrollo y el mantenimiento del fenotipo troncal, por lo que podemos asumir que la población de CSC es mayor en las células transfectadas con IKBKE en comparación con las transfectadas con el plásmido control. Para comprobar esto se pueden usar marcadores de superficie para aislar la población CSC y comprobar que esta sea mayor en células que sobreexpresan IKBKE.

Por último, el potencial carcinogénico de IKBKE se puede evaluar *in-vivo* empleando modelos animales. Introducir células transfectadas con ambos tipos de vectores y observar el desarrollo del tumor *in-vivo* será un indicativo del potencial carcinogénico de IKBKE. Asimismo, reducir la actividad de IKBKE en células que lo sobreexpresan debería revertir los efectos observados en el fenotipo.

X REFERENCIAS

- Aabo K, Vindeløv LL, Spang-Thomsen M. (1995). Clonal dominance between subpopulations of mixed small cell lung cancer xenografts implanted ectopically in nude mice. *Eur J Cancer*. 31A(2):222-9.
- Aaronson SA. (1991). Growth factors and cancer. *Science*. 254(5035):1146-53.
- Abdelalim EM, Tooyama I. (2014). Knockdown of p53 suppresses Nanog expression in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 443(2):652-7.
- Aktan F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 75(6):639-53.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. 5th edition. New York: Garland Science.
- American Cancer Society (ASC), consultado en 2016, disponible en línea a través de: <http://www.cancer.org>
- Banerjee K, Resat H. (2016). Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer*. 138(11):2570-8.
- Barbie TU, Alexe G, Aref AR, et al. (2014). Targeting an IKBKE cytokine network impairs triple-negative breast cancer growth. *The Journal of Clinical Investigation*. 124(12):5411-5423.
- Bergers G, Benjamin LE. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 3(6):401-10.
- Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, et al. (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(27):10137-42.
- Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, Kim SY, Firestein R, et al. (2007). Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell*. 129(6):1065-79.

Burkhardt DL, Sage J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 8(9):671-82.

Challa S, Guo J, Ding X, Xu CX, Li Y, et al. (2016). IKBKE is a substrate of EGFR and a therapeutic target in non-small cell lung cancer with activating mutations of EGFR. *Cancer Res*.

Chandek C, Mooi WJ. (2010). Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol*. 17(1):42-8.

Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, et al. (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis*. 4:e875.

Cochrane, C. R., Szczepny, A., Watkins, D. N., & Cain, J. E. (2015). Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*, 7(3), 1554–1585.

Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. (2006). Epidemiology: identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer*. 6(1):75-83.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 436(7051):642.

DeVita, V. T., Hellman, S., & Rosenberg, S. A. (2008). *Cancer: Principles & practice of oncology*. (9th ed.). Philadelphia: Lippincott.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 26(22):3279-90.

Doherty MR, Smigiel JM, Junk DJ, & Jackson MW. (2016). Cancer Stem Cell Plasticity Drives Therapeutic Resistance. *Cancers*. 8(1), 8.

Doll, R., & Hill, A. B. (1950). Smoking and Carcinoma of the Lung. *British Medical Journal*. 2(4682):739–748.

Escary JL, Perreau J, Duménil D, Ezine S, Brûlet P. (1993). Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature*. 363(6427):361-4.

Eyler CE, Wu Q, Yan K, MacSwords JM, Chandler-Militello D, et al. (2011). Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell*. 146(1):53-66.

Fadri-Moskwik, M., Zhou, Q., & Chai, W. (2013). Beyond Telomerase: Telomere Instability as a Novel Target for Cancer Therapy. *Journal of Molecular and Genetic Medicine : An International Journal of Biomedical Research*, 7(4), 91.

Forman D., F. Bray, et al. (2014). D. Forman, F. Bray, et al. *Cancer Incidence in Five Continents*. IARC Scientific Publications No. 164.

Garcia-Echeverria C, Sellers WR. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 18;27(41):5511-26.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 1(5):555–567.

GLOBOCAN. Consultado el 13 de agosto de 2016. Disponible en línea a través de: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, et al. (2015). Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 17:25.

Guan H, Zhang H, Cai J, Wu J, Yuan J, et al. (2011) IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF- κ B. *J Pathol.* 223(3):436-45.

Guo J, Kim D, Gao J, Kurtyka C, Chen H, et al. (2013). IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 32(2):151-9.

Guo JP, Coppola D, Cheng JQ. (2011). IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *J Biol Chem.* 286(43):37389-98.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74.

Hayflick I. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 37:614-36.

Hoesel B, Schmid JA. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 12:86.

Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, et al. (2004). NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 114(4):569-81.

Hutti JE, Shen RR, Abbott DW, Zhou AY, Spratt KM, et al. (2009). Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol Cell.* 34(4):461-72.

Imrich S, Hachmeister M, Gires O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1), 30–38.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2016). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer. Disponible en línea a través de:

http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

Kalluri R, Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation.* 119(6):1420-1428.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, et al. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449(7162):557-63.

Kim R, Emi M, Tanabe K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 121(1):1-14.

Lai Y, Yu X, Lin X, He S. (2016). Inhibition of mTOR sensitizes breast cancer stem cells to radiation-induced repression of self-renewal through the regulation of MnSOD and Akt. *International Journal of Molecular Medicine,* 37(2), 369–377.

Lee JY, Lowell CA, Lemay DG, Youn HS, Rhee SH, et al. (2005). The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem Pharmacol.* 70(8):1231-40.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, et al. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 121(7):2750-67.

Li J, Huang J, Jeong JH, Park SJ, Wei R, et al. (2014). Selective TBK1/IKKi dual inhibitors with anticancer potency. *Int J Cancer.* 134(8):1972-80.

Li X, Yang Q, Yu H, Wu L, Zhao Y, Zhang C, et al. (2014). LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget,* 5(3), 788–801.

Lin L, Hutzen B, Lee HF, Peng Z, Wang W, et al. (2013). Evaluation of STAT3 signaling in ALDH+ and ALDH+/CD44+/CD24- subpopulations of breast cancer cells. *PLoS One.* 8(12):e82821.

Liu X, Fan D. (2015) The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des.* 21(10):1279-91.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 38(4):431-40.

Malhotra GK, Zhao X, Band H, & Band V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy,* 10(10), 955–960.

Manning BD, Cantley LC. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell,* 129(7), 1261–1274.

Martelli AM, Evangelisti C, Follo MY, Ramazzotti G, Fini M, et al. (2011) Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells. *Curr Med Chem.* 18(18):2715-26.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al (2007). Roles of the raf/mek/erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1773(8), 1263–1284.

McDermott SP, Wicha MS. (2010) Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol.* 4(5):404-19

Melet A, Song K, Bucur O, Jagani Z, Grassian AR, Khosravi-Far R. (2008). Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol.* 615:47-79.

Mehlen P, Puisieux A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 6(6):449-58.

Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. (2001). HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology.* 2:67-72.

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends in Biochemical Sciences,* 36(6), 320–328.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 15(2):117–134.

Muir C., Waterhouse J., Mack T. et al, eds., (1987). *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 5. Lyon International gency for Research on Cancer.

Nassar D, Blanpain C. (2016). *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications*. *Annu Rev Pathol*. 11:47-76.

National Cancer Institute, consultado el 6 de agosto de 2016, disponible en línea a través de: <http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>.

Nguyen A, Yoshida M, Goodarzi H, Tavazoie SF. (2016). Highly variable cancer subpopulations that exhibit enhanced transcriptome variability and metastatic fitness. *Nat Commun*. 7:11246.

Niederberger E, Möser CV, Kynast KL, Geisslinger G. (2013). The non-canonical I κ B kinases IKK ϵ and TBK1 as potential targets for the development of novel therapeutic drugs. *Curr Mol Med*. 13(7):1089-97.

Organización Mundial de la Salud (OMS), Fact sheet N^o 297 (2015). Disponible en línea a través de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 9(4):361-77.

Paplomata E, Zelnak A, O'Regan R. (2013). Everolimus: side effect profile and management of toxicities in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 140(3):453-62.

Park MT, Lee SJ. (2003). Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol*. 36(1):60-5.

Pavlova NN, Thompson CB. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 23(1):27-47.

Puglisi MA, Cenciarelli C, Tesori V, Cappellari M, Martini M, et al. (2015) High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *J Pathol*. 236(4):479-90.

Reya T, Clevers H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 434(7035):843-50

Rivlin N, Koifman G, Rotter V. (2015). p53 orchestrates between normal differentiation and cancer. *Semin Cancer Biol*. 32:10-7. PubMed PMID: 24406212.

Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. (2012). Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 16(1):103-19.

Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, et al. (2002). The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80(2):239-56.

Shay JW, Wright WE. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1(1):72-6.

Shay JW, Wright WE. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 21(6), 349–353.

Shortt J, Johnstone RW. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(12).

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

- Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 22(3):234-49.
- Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):791-9. PubMed PMID: 17851544.
- Tabassum DP, Polyak K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer.* 15(8):473-83.
- Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, et al. (2013). The role of NF- κ B signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 8(2):e56399.
- Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, et al. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol.* 12(8):445-64.
- Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 84(4):988-93.
- Thakur R, Trivedi R, Rastogi N, Singh M, Mishra DP. (2015). Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer. *Scientific Reports.* 5:10194.
- Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British Journal of Cancer.* 113(3):365-371.
- Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, Beyaert R. (2013) I κ B kinase ϵ (IKK ϵ): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol.* 85(7):873-80.
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell.* 132(3):363-74.
- Wallin JJ, Guan J, Edgar KA, et al. (2012). Active PI3K Pathway Causes an Invasive Phenotype Which Can Be Reversed or Promoted by Blocking the Pathway at Divergent Nodes. *Janssens V, ed. PLoS ONE.* 7(5):e36402.
- Weinberg R. A. (2007). *The Biology of Cancer.* Garland Science.
- Wong RS. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 30:87.
- Yamamoto M, Taguchi Y, Ito-Kureha T, Semba K, Yamaguchi N, et al. (2013) NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat Commun.* 4:2299.
- Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005). "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow". *Blood* 106(2): 584-92.
- Yuan, J., Zhang, F., & Niu, R. (2015). Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Scientific Reports*, 5, 17663. <http://doi.org/10.1038/srep17663>