



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**

**Análisis del Efecto de Expresión de NIK
en Cáncer de Mama**

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

José Eduardo Arreola Martínez

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Karla Itzel Vázquez
Santillán



Ciudad de México, Junio 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **ARREOLA MARTÍNEZ JOSÉ EDUARDO**, con número de cuenta **304006670**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **06 de junio de 2017** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
- VOCAL** M. en C. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN*
- SECRETARIO** M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES
- SUPLENTE** Dr. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN
- SUPLENTE** M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

El título de la tesis que presenta es: **Análisis del efecto de la expresión de NIK en células de cáncer de mama.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 14 de marzo de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. SO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Dedicatoria

A la memoria de mis abuelos José Socorro Arreola y María de los Ángeles Aguirre así como Arnulfo Martínez, sé que desde el cielo me guían y me cuidan

Agradecimientos

A mis padres:

Por su apoyo infinito, por sus consejos, por sus desvelos, por qué parte de lo que soy es por ustedes y no me alcanzaría la vida para agradecerles. Este logro es por ustedes y para ustedes.

A mi Abuela:

Por sus cuidados y sus atenciones, por procurarme y aconsejarme, por sus desvelos y el cariño que me ha brindado cada día de mi vida.

A mi Hermano:

Por sus enseñanzas, porque a pesar de todo, siempre ha estado conmigo como un verdadero amigo, en las buenas y en las malas.

A mi Familia:

Gracias a Dios por darme la familia que tengo, siempre unidos en la prosperidad pero más en la adversidad.

A la persona que amo:

Gracias por tu apoyo a lo largo de este proceso, siempre estás conmigo y espero que tengamos más logros juntos.

A mis amigos:

Por formar parte de mi vida, por su apoyo, por sus consejos y las pláticas extendidas que hemos compartido, porque siempre han estado en cada momento bueno o malo.

A mi Asesora Karla Itzel:

Por su paciencia y atenciones en la realización de este proyecto, pero sobre todo, agradecimiento infinito por los conocimientos brindados y permitirme ser parte de este proyecto.

A mi Asesor Interno y sinodales:

Por sus atenciones, por sus consejos y observaciones en la revisión de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por permitirme ser parte de esta gran familia universitaria, por las facilidades brindadas para formar mi desarrollo académico, así como por las oportunidades para ampliar mi conocimiento.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y al Instituto Nacional de Medicina Genómica:

Por brindarme la oportunidad y las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Cáncer de Mama	3
1.3 Tipos de Cáncer de Mama	5
1.4 NF- κ B	8
1.5 NIK	13
1.6 NIK en Cáncer	14
2. Hipótesis	17
3. Objetivos Generales	17
4. Objetivos Particulares	17
5. Método.....	18
5.1 Cultivo Celular	18
5.2 Sobre Expresión de NIK	18
5.2.1 Amplificación y expresión del vector pT-REx-DEST30-NIK y el vector pT-REx/GW/30/lacZ	19
5.2.2 Digestión de los plásmidos.....	20
5.3 Transfección en células MCF-7.....	21
5.4 Extracción de RNA y RT-PCR	21
5.5 Fraccionamiento de proteínas citosólicas y nucleares.....	23
5.6 Western Blot	23
5.7 Inmunofluorescencias.....	24
5.8 Ensayos Clonogénicos	25

5.9 Ensayos de Formación de Tumores.....	25
6. Resultados	25
6.1 Digestión de Plásmidos	25
6.2 Células Transfectadas	28
6.3 Sobre expresión de NIK en las células transfectadas.....	29
6.4 Western Blot	31
6.5 Características de las líneas estables.....	33
6.6 Análisis de Marcadores de fenotipo tumorigénico.....	35
6.7 Ensayo de Clonogenicidad	37
6.8 Ensayo Tumorigénico	38
7. Discusión de Resultados	40
8. Conclusión.....	45
9. Bibliografía.....	46

Análisis del Efecto de la Expresión de NIK en Cáncer de Mama

1. Introducción

1.1. Cáncer:

El Cuerpo Humano está compuesto por millones de células que en condiciones normales crecen, se dividen y mueren de una manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona las células normales se dividen rápidamente para facilitar el crecimiento. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para remplazar a las células que han sufrido daño o que se encuentran en proceso de apoptosis. Cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada se origina el Cáncer (1).

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada y autónoma de las células. Estas células pueden multiplicarse sin control y evadir los mecanismos de muerte celular, estas y otras características eventualmente conducen a la invasión de tejidos adyacentes y en muchos casos la diseminación de las células hacia sitios distantes y el establecimiento de nuevos tumores.

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial debido a la alta incidencia y mortalidad de esta enfermedad. A pesar de que se han logrado grandes avances para reducir las tasas de mortalidad e incidencia, el cáncer es responsable del mayor número de muertes en comparación con las enfermedades cardiovasculares en personas menores de 85 años. Desde el 2008,

el cáncer es la principal causa de mortalidad en el mundo y la tercera causa en la población mexicana, esto se debe principalmente a que el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas, por lo que la tasa de mortalidad en México en el 2009 fue de 65 por cada 100,000 habitantes. En la mayoría de los pacientes que desarrollan algún tipo de cáncer, la enfermedad ocurre de forma esporádica ya que no cuentan con algún antecedente hereditario y en la mayoría de estos casos se desarrolla en edad avanzada a consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas que ocurren a lo largo de la vida de este tipo de pacientes. Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de pacientes que debido a su historial hereditario, presentan susceptibilidad a desarrollar algún tipo de cáncer.

Desde el punto de vista molecular, el cáncer se inicia debido a la acumulación de alteraciones en genes esenciales que controlan la proliferación y muerte celular de las células (2). En general, todos los tipos de cáncer comparten varios rasgos o capacidades moleculares y celulares como 1) potencial replicativo ilimitado, 2) adquisición de auto-suficiencia respecto a señales de crecimiento, 3) evasión de señales inhibitorias de crecimiento, 4) evasión de apoptosis, 5) formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y 6) capacidad de invadir tejidos adyacentes y generar metástasis. Recientemente, se han descrito nuevas características de las células cancerosas, como alteraciones del metabolismo energético tumoral y la evasión del sistema inmune (Fig.1). Además, se ha reconocido el papel del microambiente tumoral y la inflamación en el desarrollo y mantenimiento de los tumores (3).

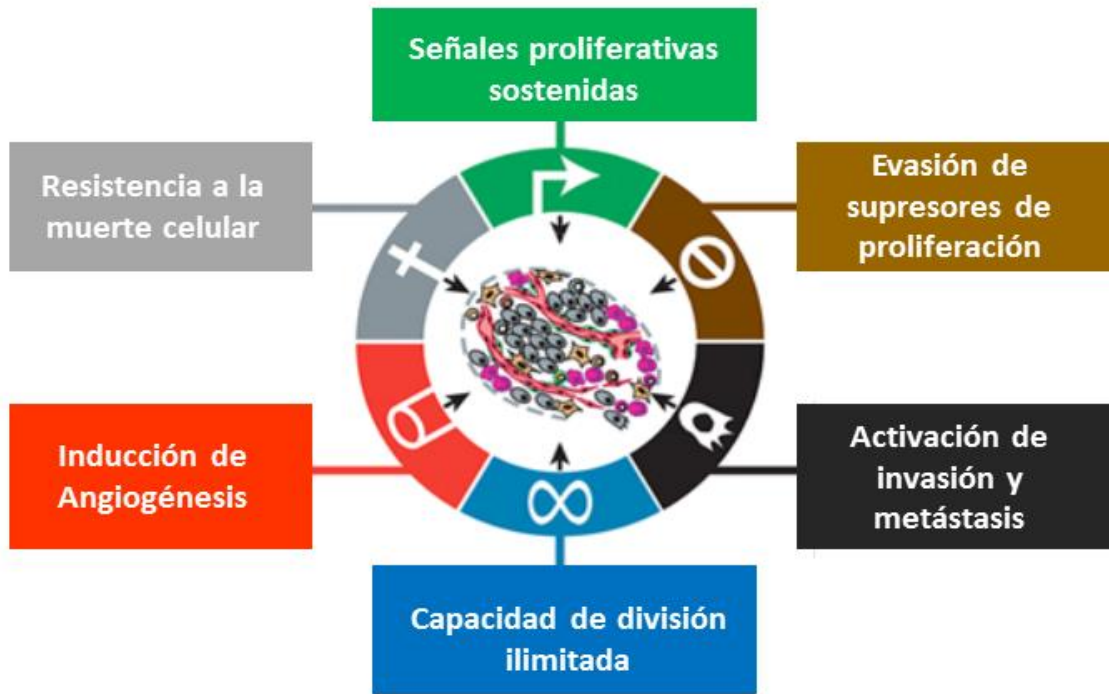


Figura 1. Principales características de las células Cancerosas

A nivel mundial, la mayor parte de la mortalidad anual por cáncer es principalmente debido al cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama (4).

1.2. Cáncer de Mama

El cáncer de mama surge por la transformación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la glándula mamaria. Estos ductos están formados por células luminales y células mioepiteliales o basales, así como de una membrana basal que reviste al ducto (Fig. 2). Las células luminales se desarrollan a partir de la capa interna de revestimiento del ducto mamario. Las células basales

(mioepiteliales) se caracterizan por la expresión de citoqueratinas (CK) 5 y 14 así como del receptor EGF (EGFR).

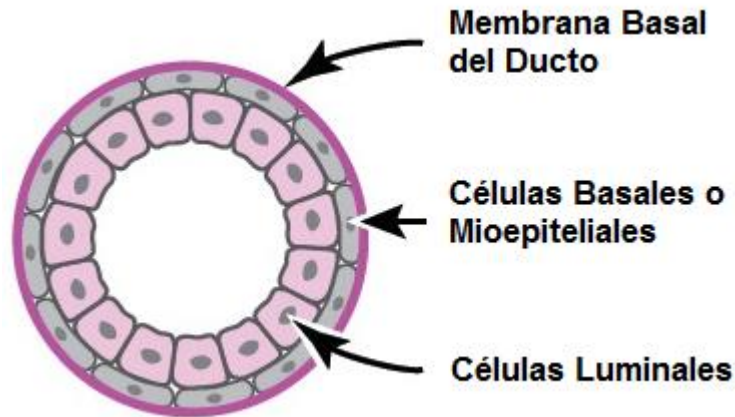


Figura 2. Lobulillo o Ducto de la Glándula Mamaria.

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que tan solo en 2012 ocurrieron 521,000 muertes a nivel mundial a causa de este padecimiento y aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo. En México, el cáncer de mama, es la primer causa de mortalidad por tumores malignos y constituye la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años y desde 2006, el cáncer de mama es responsable de más muertes al año que el cáncer cérvico-uterino (5). Es por ello que durante varios años se han analizado las características de las células

cancerosas para poder comprender los mecanismos moleculares que conducen a la iniciación y progresión del cáncer (6).

A pesar de que actualmente existen tratamientos más eficaces para tratar de manera oportuna el cáncer de mama, las tasas de incidencia y mortalidad a causa de esta neoplasia siguen siendo muy elevadas, De tal forma que es necesario llevar a cabo un exhaustivo análisis para determinar los factores que están involucrados en el origen y desarrollo de esta enfermedad, con la finalidad de generar futuras estrategias más adecuadas que permitan eliminar el cáncer.

Los factores relacionados con el desarrollo, proliferación, crecimiento y muerte celular, son de vital importancia para entender los mecanismos que conducen a la enfermedad (3).

1.3 Tipos de Cáncer de Mama

Existe una gran variación de parámetros para clasificar a los diferentes tipos de cáncer de mama, la más actual y sugerida es la clasificación molecular ya que proporciona un mejor diagnóstico en su aplicación clínica (7).

La clasificación molecular del cáncer de mama ha sido posible gracias a los recientes avances tecnológicos en ciencias genómicas. Estos avances han permitido definir subtipos moleculares que presentan características clínicas específicas y ha sido posible generar estrategias terapéuticas más eficaces para cada tipo molecular (8).

Esta clasificación se realiza en base a la expresión simultánea de miles de genes analizados en un solo experimento mediante la técnica de microarreglos de expresión. De esta forma, en base a los perfiles de expresión del cáncer de mama, se han definido 5 tipos principales de cáncer de mama, el subtipo luminal, HER2, basal, claudin-low y el tipo normal (9).

Subtipo Luminal: Se caracteriza por una elevada expresión del receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR). Se denomina luminal ya que poseen características de células epiteliales luminales. Este tipo de cáncer presenta una baja expresión de genes involucrados en la proliferación celular. Este subtipo se puede dividir en 2 grupos Luminal A y Luminal B. El Subgrupo A se caracteriza por la expresión de ER, PR, Bcl-2 y CK8/18 y por la nula o baja expresión de HER2. El subtipo luminal A tiene un mejor pronóstico además de que este tipo de tumores tiene un riesgo reducido de formación de metástasis. Este tipo de cáncer puede tratarse con hormonas de tercera generación inhibidoras de aromatasa o con un antagonista del receptor de estrógenos (tamoxifen). En contraste, el subgrupo Luminal B, presenta un fenotipo mayormente agresivo así como un alto índice proliferativo y un peor pronóstico. Los tumores pertenecientes al subgrupo luminal B, también expresan ER, PR y generalmente expresan HER2 y EGFR. La característica biológica principal de este Subgrupo es la expresión de genes de proliferación como es MK167 y Ciclina-1.

Subtipo HER2+: Entre el 15 y el 20% de todo el cáncer de mama corresponden a este subtipo. Se caracteriza por la alta expresión del gen HER2 y otros genes asociados con la vía de HER2. Presentan una sobre expresión de genes

relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y proteólisis; y una baja expresión de genes del subtipo luminal. Son altamente proliferativos y aproximadamente 40% presentan mutaciones en el gen p53.

Subtipo basal: Este tipo de tumores se caracteriza por la nula expresión de ER, PR y HER2, de tal forma que se les conoce como tumores triples negativos porque no expresan ninguno de estos receptores. Se les denomina basal, porque sus perfiles de expresión, se asemejan a los perfiles de células basales que se encuentran en los ductos de la glándula mamaria. El subtipo basal, expresa genes involucrados en proliferación y altos niveles de marcadores de células basales como citoqueratina 5/6, 14 y 17. Este tipo de tumores es clínicamente muy agresivo, y tiene alta capacidad de metástasis. Además, actualmente no existen terapias específicas para este tipo de tumores, por lo que los pacientes que presentan este subtipo tienen un mal pronóstico en respuesta a varias terapias. Interesantemente, en este subtipo molecular la vía de NF- κ B esta activa constitutivamente y su activación confiere ventajas proliferativas.

Subtipo Normal: Tiene perfiles de expresión muy parecidos al de las células normales de la glándula mamaria. Estos tumores se caracterizan por la expresión de muchos genes característicos de células adiposas y otros genes expresados por células no epiteliales. Los tumores de tipo normal tienen un mejor pronóstico y los pacientes suelen responder adecuadamente a las terapias ya que son menos agresivas en comparación con otros subtipos (7).

Subtipo Claudin-Low: Se caracteriza por la ausencia de marcadores de diferenciación luminal y por la sobreexpresión de marcadores de la transición epitelio-mesénquima y genes involucrados en la respuesta inmune. Se denomina Claudin-low, porque estos tumores expresan bajos niveles de proteínas de adhesión como claudinas 3, 4, 7 y e-cadherina. Al igual que el subtipo basal, la mayoría de los tumores claudin-low son triples negativos para ER, PR y HER2, además, este subtipo también tiene una alta actividad de la vía NF- κ B. Interesantemente, los tumores Claudin-low tienen perfiles de expresión similares a los perfiles de células troncales cancerosas (CTCs), las cuales son responsables del mantenimiento y progresión de los tumores.

Los tumores de tipo Claudin-low son más agresivos en comparación con los otros subtipos y los pacientes con este tipo de cáncer, tienen un pronóstico menos favorable en respuesta a las terapias convencionales. Debido a esto, es importante analizar y estudiar las vías de señalización así como los factores moleculares que intervienen en la progresión del cáncer (10).

1.4. NF- κ B

La familia de NF- κ B está formada por un grupo de factores de transcripción que regulan la expresión de diversos genes implicados en la regulación de múltiples procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis, invasión y metástasis.(11). Esta vía puede ser activada por diversos estímulos incluyendo citosinas como TNF α e IL-1, radiación UV, entre otros (12,13).

Este factor de transcripción fue descubierto en 1986 en el laboratorio de David Baltimore donde observaron que esta proteína actuaba como modulador de la transcripción de la cadena ligera de las inmunoglobulinas en los Linfocitos B (14).

La familia NF- κ B está formada por cinco proteínas; p105/p50, p100/p52, RelB, RelA y c-Rel. Estas proteínas pueden formar homo o heterodímeros para unirse a los sitios kb en el promotor de sus genes blancos y activar su transcripción (15).

Estos factores de transcripción, comparten entre si un dominio N-terminal denominado RHD (Rel Homology domain). Este dominio está formado por 300 aminoácidos y es el responsable de la dimerización entre los miembros de la familia NF- κ B, así como de la asociación con inhibidores de NF- κ B (I κ B) y de la unión con sitios kb en el ADN.

Los miembros de la familia NF- κ B pueden dividirse en 2 subfamilias; la subfamilia I incluye a las proteínas RelA, RelB y c-Rel, las cuales poseen un dominio TAD (en inglés transcription activation domain) localizado en el extremo Carboxy-terminal. El dominio TAD es necesario para la regulación positiva de la expresión génica. Esta clase de proteínas son sintetizadas en su forma madura. La subfamilia II incluye a los miembros p105 y p100, los cuales carecen de un dominio TAD y son sintetizados como precursores. Estas proteínas tienen que ser procesadas proteolíticamente para formar las proteínas maduras denominadas como p50 y p52 respectivamente (16).

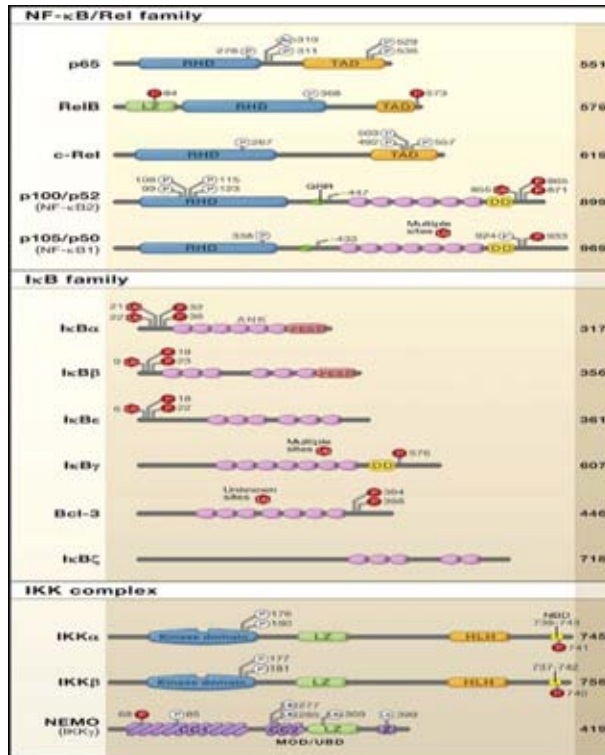


Figura 3. Miembros de la familia de NF-κB y sus inhibidores. Se muestran los miembros de la familia NF-κB, sus dominios y su estructura funcional. También se detalla la estructura de la familia de inhibidores IκB.

La familia de NF-κB es regulada por inhibidores de NF-κB denominados IκB, entre los cuales se encuentran IκBα, IκBβ e IκBε. Estos inhibidores interactúan y forman complejos con NF-κB causando la retención de las moléculas en el citoplasma impidiendo así su translocación al núcleo. Las proteínas IκB a su vez son reguladas por cinasas IKK's, las cuales fosforilan y provocan la degradación de estos inhibidores, permitiendo que los dímeros se trasloquen al núcleo (17).

La translocación nuclear de factores NF- κ B puede llevarse a cabo mediante dos vías de señalización, la vía canónica y la vía alternativa.

La vía Canónica puede ser activada por diversos estímulos incluyendo varias citosinas y productos virales o bacterianos. Estos ligandos se unen a receptores específicos en la membrana de las células provocando la activación de un complejo de cinasas IKK formado por una subunidad de IKK α , IKK β y la subunidad regulatoria NEMO. Este complejo de cinasas induce la fosforilación de I κ B provocando su degradación y desencadenado la translocación nuclear de los heterodímeros p50-RelA (18).

La vía Alternativa o no Canónica es activada mediante receptores que están involucrados en la formación de órganos linfoides y desarrollo linfocítico como es el caso de la linfotoxina β (LT β R), el receptor activador de NF- κ B (RANK) y CD40. Esta vía se encuentra regulada por la cinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual fosforila al complejo IKK, formado por dos dímeros de la cinasa IKK α . NIK e IKK α participan en la fosforilación del extremo C-terminal de p100. Esta fosforilación provoca la poliubiquitinación de p100 causando la degradación del extremo C-terminal de la proteína. El extremo carboxy terminal de p100 impide que el heterodímero p100/RelB sea translocado al núcleo, de tal manera que p100 funciona como un inhibidor de NF- κ B reteniendo al dímero en el citoplasma hasta que es procesado por el proteosoma. Este procesamiento es necesario para que se lleve a cabo la translocación nuclear del heterodímero p52/RelB (19,20).

La vía de NF- κ B está involucrada en muchos procesos celulares por lo que se ha considerado que juega un papel importante para la expresión de la mayoría de los marcadores tumorales en diversos tipos de cáncer (21). Evidencias recientes han demostrado que la vía de NF- κ B esta constitutivamente activa en una población de células troncales cancerosas (CTCs). Las CTCs son una subpoblación dentro de un tumor, las cuales pueden auto-renovarse y diferenciarse en varios tipos de células tumorales. Las CTCs son altamente tumorigénicas, y relativamente resistentes a la quimioterapia convencional y radioterapia. Las CTCs son las responsables de mantener el crecimiento de un tumor y se piensa que son las responsables de la formación de metástasis. Algunos estudios previos han propuesto que la activación de NF- κ B en CTCs regula la capacidad de auto-renovación de estas células, sin embargo, aún no se precisa el mecanismo molecular mediante el cual ocurre la regulación (22).

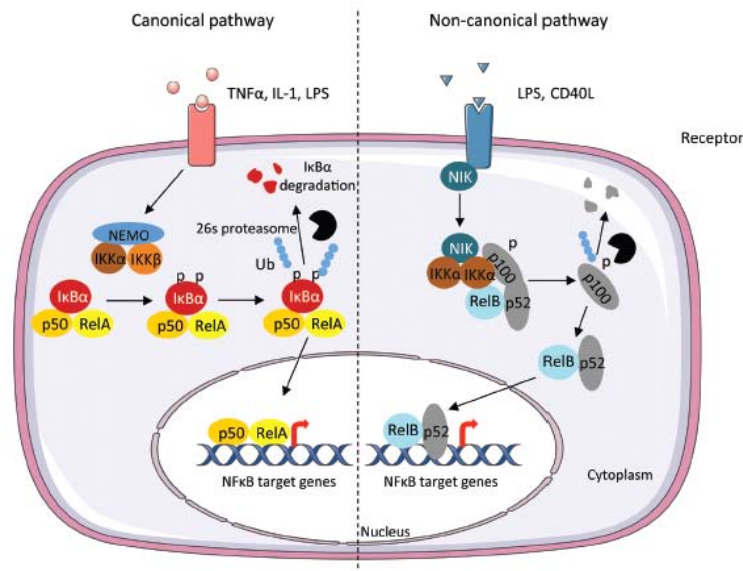


Figura 4. Principales vías de activación de NF- κ B.

1.5. NIK

NIK es una cinasa serina treonina también llamada MAP3K14 (mitogen-activated protein 3 kinase 14). El gen NIK se localiza en el cromosoma 17q21 y codifica una proteína de 104 kDa, la cual se localiza principalmente en el citoplasma, aunque también se encuentra en núcleo (23).

NIK induce la activación de la vía alternativa de NF- κ B a través de la fosforilación de IKK α , aunque también se ha reportado que NIK fosforila a I κ B β y puede participar en la activación de la vía canónica. En condiciones basales, la proteína NIK es degradada continuamente gracias a la interacción con las proteínas ubiquitin ligasas TRAF2 y TRAF3 las cuales permiten la unión de proteínas cIAP1 y cIAP2 que en conjunto provocan la degradación de NIK (24).

La proteína NIK es necesaria para la activación de la vía de NF- κ B inducida por TNF α y participa en el procesamiento de p100 a p52 (25). La proteína NIK tiene varios dominios que le permiten interactuar con IKK α , p100 y con las moléculas que regulan su estabilidad. Los cuatro dominios de NIK son la región básica, la región rica en prolina, el dominio cinasa y el dominio de unión a TRAF que se localiza en el extremo C-Terminal. El extremo carboxy terminal de NIK es el responsable de las diversas interacciones, a través de este dominio NIK puede interactuar con IKK α , p100 y las ubiquitin ligasas TRAF1, 2, 5 y 6. TRAF3 interactúa con NIK a través del extremo N-terminal, interesantemente, la delección de este dominio provoca la estabilización de NIK ya que TRAF3 es necesario para la degradación de esta cinasa (26).

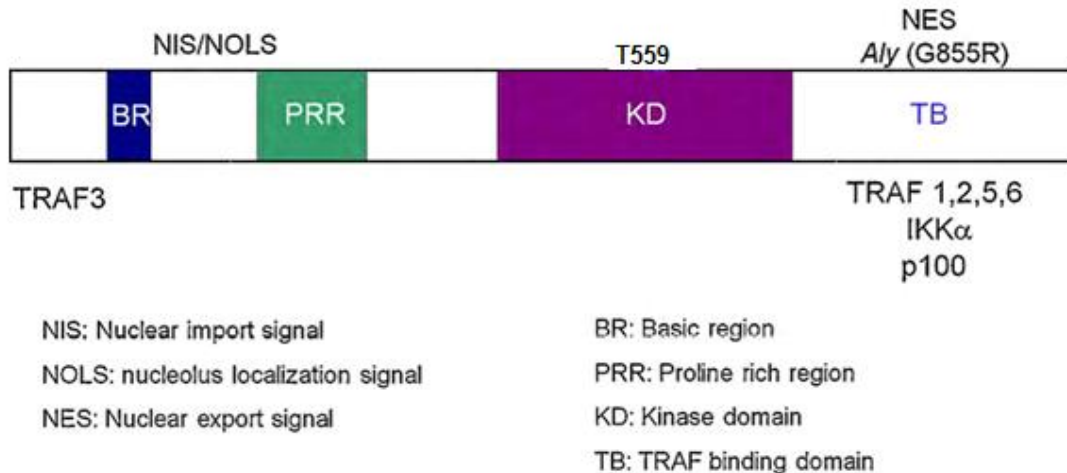


Figura 5. Dominios de NIK y sitios de interacción.

La proteína NIK tiene también señales de importe y exporte nuclear localizadas en el extremo N-Terminal y el C-Terminal respectivamente. Estas señales son las responsables de que NIK pueda entrar y salir del núcleo.

El papel de NIK en la activación de la vía no canónica se ha podido elucidar mediante el estudio de una mutación a nivel molecular en el gen de NIK que ocurre de forma natural en ratones. Esta enfermedad es llamada Alymphoplasia (*aly*). *Aly*-NIK es incapaz de unirse a IKK α y p100, por lo tanto las células con *aly*-NIK fallan al activar la vía no canónica de NIK (26,27).

1.6 NIK en Cáncer

Estudios previos han demostrado que muchas neoplasias hematológicas poseen alteraciones en el gen de NIK, en la actividad de NIK o en la expresión de la

proteína y se ha determinado que la inhibición de NIK reduce la sobrevivencia de las células cancerosas (28,29).

En células de mieloma múltiple se han observado varias mutaciones y deleciones en los genes TRAF2, TRAF3 y cIAP's que regulan la degradación de NIK. La alteración de estos genes ocasiona acumulación de NIK y sobre-activación de la vía no canónica de NF- κ B (30).

Estudios posteriores, han demostrado que la sobre-expresión de NIK en fibroblastos de Rata ocasiona la transformación celular de estos fibroblastos, de manera que NIK parece ser una cinasa importante en el inicio y progresión del cáncer. La inhibición de NIK mediante RNA de interferencia en leucemia de células T disminuye la actividad de NF- κ B y suprime el crecimiento tumoral en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (NOD/SCID). Estos resultados demuestran que la regulación en la expresión de NIK juega un papel muy importante en la activación de NF- κ B en ATL's y fibroblastos murinos, sugiriendo también que NIK es un atractivo blanco para el estudio del cáncer (28).

En tumores sólidos, existen algunos reportes que resaltan la importancia de NIK en la tumorigenesis, sin embargo, el mecanismo por el cual NIK modula el crecimiento tumoral no ha sido explorado completamente (31).

En células de melanoma metastático y melanoma primario, la inhibición de NIK provoca una disminución en la proliferación y un aumento en la apoptosis. Así mismo, la inhibición de NIK causa una disminución en la expresión de genes implicados en tumorigénesis (23).

En cáncer de mama, se ha demostrado que las líneas celulares de tipo basal, tienen activa la vía de NF- κ B y expresan niveles altos de NIK. En contraste, las líneas celulares de tipo luminal expresan bajos niveles de NIK y poca actividad de NF- κ B (Fig. 6). Cabe mencionar que NIK está involucrado con la proliferación del cáncer de tipo basal (9).

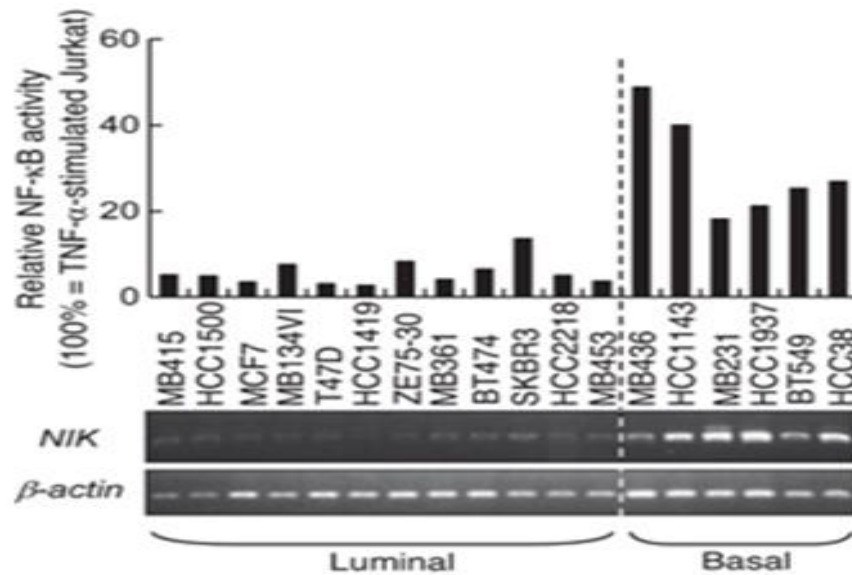


Figura 6. Expresión de NIK en distintas líneas celulares de cáncer de mama de tipo lumina y basal (9).

La actividad de esta proteína podría jugar un papel muy importante en el mantenimiento del cáncer de mama así como en los procesos moleculares relacionados a la actividad de NF- κ B. NIK parece ser un blanco terapéutico atractivo para disminuir la capacidad tumorigénica de las células, sin embargo, es necesario realizar más estudios para entender los mecanismos y procesos en los

que esta proteína está involucrada. En el laboratorio hemos analizado la inhibición de NIK en líneas celulares de cáncer de mama y hemos demostrado que NIK afecta la capacidad tumorigénica e invasiva de las células cancerosas. Con respecto a la sobre-activación de NIK, aún se desconocen los efectos de la expresión en células de cáncer de mama.

2. Hipótesis:

NIK es una proteína esencial que activa la vía no canónica de NF- κ B, involucrada en procesos de diferenciación, invasión y migración. La expresión forzada de NIK en células de cáncer de mama probablemente induzca la sobreexpresión de genes asociados a dichos procesos.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de NIK en la adquisición de un fenotipo tumorigénico de la línea celular MCF-7.

4. Objetivos Particulares

- Sobre-expresar NIK establemente en la línea celular MCF-7 mediante transfección celular con el vector pT-REx-DEST30 el cual contiene el marco de lectura del gen NIK.
- Determinar y comprobar que las líneas estables transfectadas sobreexpresan NIK
- Analizar la expresión de los genes NANOG, SOX2, OCT4, VIM, SNAIL, MUC1 y CXCR4 en las líneas estables transfectadas que sobreexpresan

NIK para determinar si la expresión de NIK induce la expresión de marcadores que promueven la tumorigenesis.

- Determinar el efecto de la sobre-expresión de NIK en la capacidad clonogénica (formación de colonias a partir de un número limitado de células) y tumorigénica (capacidad de formar tumores en ratones inmunosuprimidos) de las células MCF-7 transfectadas.
- Analizar el efecto de la sobreexpresión de NIK en la regulación de genes involucrados en invasión, migración, así como los relacionados con la adquisición de un fenotipo tumorigénico (OCT4, NANOG, SOX2, VIM, SNAIL, MUC1 y CXCR4) en las células MCF-7.
- Determinar la expresión de proteínas de la vía de NF- κ B que son reguladas por NIK (p52, RelB y p65)

5. Método

5.1 Cultivo celular

Las células MCF-7 fueron obtenidas de ATCC y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB, en condiciones de 37°C y 5% de CO₂, estas mismas condiciones fueron utilizadas para cultivar las células MCF-7 transfectadas.

5.2 Sobre-expresión de NIK

Para sobre-expresar NIK se utilizó el vector pT-REx-DEST30-NIK (NIK+), el cual contiene el marco de lectura que codifica para el gen NIK y como control se utilizó

el mismo vector con el marco de lectura para el gen bacteriano LacZ (pT-REx-GW30-lacZ).

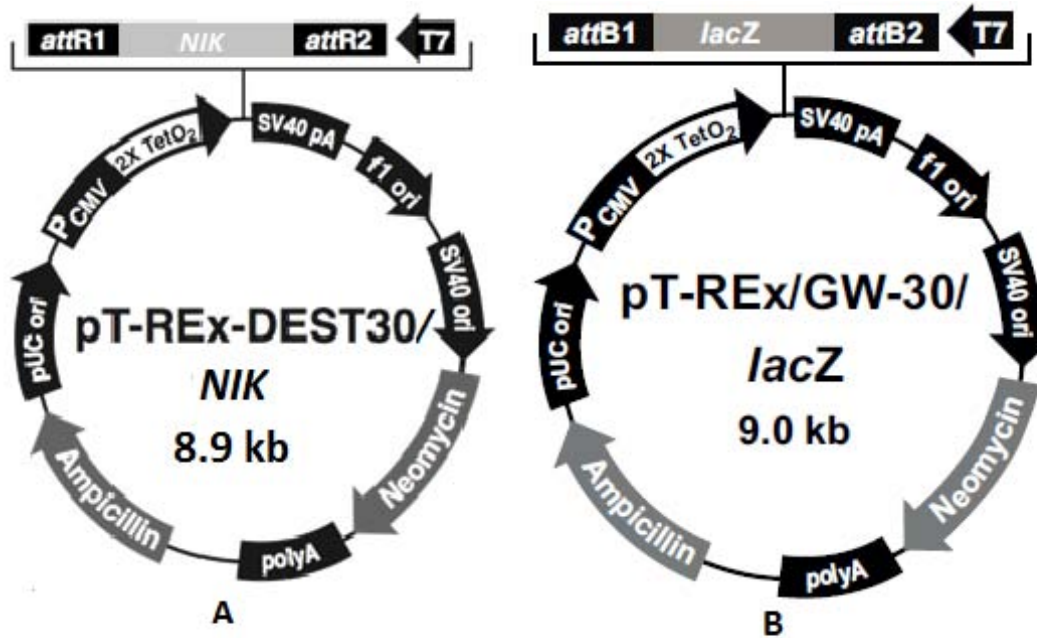


Figura 7. Diagramas de los vectores empleados A) vector +NIK que contiene el marco de lectura de NIK así como el de resistencia a Neomicina (G-418). De igual forma en B) se muestra el diagrama del Vector Control con el marco de lectura a resistencia a G-418

5.2.1 Amplificación y expresión del vector pT-REx-DEST30-NIK y el vector pT-REx/GW/30/lacZ.

Para obtener la cantidad necesaria de plásmido para la transfección se amplificó los vectores utilizados mediante transformación bacteriana. Para llevar a cabo la transformación se utilizó el kit TransformAID de Fermentas en bacterias E. Coli-

DH5-alfa introduciendo los vectores mediante choque térmico siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante.

Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar LB Broth con 100µg/ml de ampicilina. Las bacterias transformadas se seleccionaron debido a la expresión de un gen bacteriano que confiere resistencia a ampicilina.

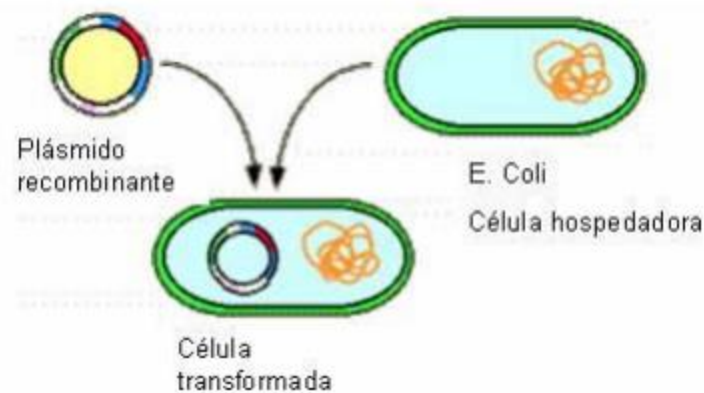


Figura 8. Transformación Bacteriana.

Para la extracción del plásmido se utilizó el Kit High Speed Maxi Prep (QIAGEN) utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante.

5.2.2. Digestión de plásmido

El plásmido se digirió con las enzimas de restricción Eco-RV y MLU1 con la finalidad de comprobar su identidad. Para la digestión con EcoRV se incubó durante 1hr a 37°C y se inactivó a 80°C durante 20 minutos. La digestión con Mlu1 se realizó durante 1hr a 37°C y se inactivó a 65°C durante 20 minutos.

Posteriormente, el DNA se corrió en un gel de agarosa al 0.8% para comprobar que el plásmido obtenido era el correcto.

5.3. Transfección en células MCF-7

Para transfectar las células, se utilizó el protocolo de Lipofectamina LTX (Invitrogen), brevemente, las células se transfectaron con 3000ng de plásmido y 7.5µl de lipofectamina en medio sin suero durante 16 horas y posteriormente se retiró el medio y se agregó medio con 5% SFB. Los plásmidos utilizados tienen el gen de resistencia al antibiótico G418, por lo que se realizaron curvas de selección para determinar la mínima concentración que provoca muerte masiva en 7 días. La selección de las células transfectadas inicio 48 horas después de la transfección y se seleccionaron con 100mg/ml de G418 (Gibco) durante 3 semanas. El medio de selección fue remplazado cada tercer día. Las células se trabajaron a una confluencia de 80% para los posteriores experimentos.

5.4. Extracción de RNA y RT-PCR.

El RNA total se extrajo utilizando Trizol Reagent (Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA se analizó en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes. La concentración de RNA se determinó mediante el uso de NanoDrop. El ensayo de RTPCR se llevó acabo usando 2000ng de RNA de ambas líneas transfectadas (MCF-7 +NIK y MCF-7 Control) utilizando el kit High Speed cDNA (Applied Biosystems). Posteriormente, 1 µl de cDNA obtenido fue utilizado para llevar a cabo una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para los genes

estudiados. La secuencia de cada primer y la temperatura de fusión (T_m) se encuentran en la Tabla 1. Para la reacción de PCR, se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo de 95 °C por 10 minutos, seguida de 25-35 ciclos de 95°C por 30 segundos, T_m por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente un ciclo de extensión de 72°C por 5 minutos. El número de ciclos para cada gen se determinó mediante una curva de saturación. Para visualizar los productos amplificados, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con bromuro de etidio.

Tabla 1.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA	T _m (°C)
NIK F	5'-TTAGAAACACCCCGCAGTTC-3'	56°
NIK R	5'-TCCACACGTGGTTCAGACAT-3'	56°
Snail F	5'-CCTGCTGGCAGCCATCCCAC-3'	64°
Snail R	5'-TCCTGGAGCCGAAGGGAGGC-3'	64°
Nanog F	5'-CCAGTCCCAAAGGCCAAAC-3'	56°
Nanog R	5'-AGGCATCCCTGGTGGT-3'	56°
Sox2 F	5'-AGGAGTTGTCAAGGCAGAG-3'	56°
Sox2 R	5'-CCGCCGATGATTGTTATT-3'	56°
Oct4 F	5'-ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAAC-3'	56°
Oct4 R	5'-CTGAATACCTTCCCAAATAGAACCC-3'	56°
Vimentina F	5'-TGGCCGACGCCATCAACACC-3'	64°
Vimentina R	5'-GTCCTCGGCCAGGTTGTCGC-3'	64°
MUC F	5'- CAGCTGCCCGTAGTTCTTTC-3'	56°
MUC R	5'- AGACGTCAGCGTGAGTGATG- 3'	56°
IKKa F	5'- GACTTGATGGAATCTCTGGA- 3'	50°
IKKa R	5'- GATGCCATATTTCTTTCTGC- 3'	50°
IKKB F	5'-GCAGCAGAAGTACACAGTGA- 3'	54°
IKKB R	5'- ATGTCCACCTCACTCTTCTG- 3'	54°
TBP F	5'- CCACAGCTCTTCCACTCACA -3'	56°
TBP R	5'- CTCATGATTACCGCAGCAAA - 3'	56°
CXCR4 F	5'- CTGAGAAGCATGACGGACAA - 3'	56°
CXCR4 R	5'- GACGCCAACATAGACCACCT -3'	56°

5.5. Fraccionamiento de proteínas citosólicas y nucleares

Para la extracción de proteínas citosólicas y nucleares se utilizaron 2 millones de células, brevemente, las células fueron raspadas y se centrifugaron a 1500 rpm durante 1 minuto. El pellet de células se resuspendió en 500µl Buffer A (100 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM MgCl₂, 4M KCl, 500 mM EDTA, 250mM EGTA) suplementado con 1x de un Coctel Inhibidor de Proteasas (PIC). Las proteínas se incubaron en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se adicionó una solución NP-40 al 10% y se resuspendió con ayuda de un equipo Vortex, incubando en hielo durante 2 min. Inmediatamente terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 5 min. Finalmente se extrajo el sobrenadante ya que este contiene las proteínas Citosólicas y se almacenó a -20°C. El pellet restante que contiene las proteínas nucleares se disolvió en Buffer C (100mM Hepes (pH 7.5), 4M NaCl, 500mM EDTA, 50% Glicerol, 1X PIC) y se incubó la muestra a 4°C durante 30 min. Posteriormente centrifugamos a 8000 rpm durante 5 min a 4°C y se trasladó la fase acuosa conteniendo las proteínas nucleares a un tubo Eppendorf y se almacenaron a -20°C.

5.6. Western Blot

Para la detección de las proteínas de interés se utilizó el método de Western Blot que consistió en la transferencia de proteínas tanto nucleares como citosólicas para reconocer a p52, RelB, tubulina y nucleolina. Para llevar a cabo la transferencia se utilizaron geles de poliacrilamida utilizando un Gel separador al 10X y un Gel Concentrador 10X. Para cerciorarnos que cada carril del gel contenía

la misma concentración proteica de cada muestra se cuantificaron utilizando el Kit Bradford y posteriormente se calculó la concentración utilizando una Curva Patrón para que cada muestra contuviese 40mg. Posteriormente se prepararon las muestras adicionando 2.5µl de Buffer de Carga por cada 10µl de muestra. Se colocó en el Gel para transferir a 80v durante 2hrs. Posteriormente se transfirió el contenido del Gel a una membrana utilizando una cámara semi-humeda durante 20 min a 15V. En seguida se incubó la membrana en Solución de Bloqueo al 5% durante toda la noche. Posteriormente se dividió la membrana de tal manera que se pudiese identificar las proteínas de interés utilizando los siguientes anticuerpos primarios para RelB (1/100), p52 (1/100), Nucleolina (1/300) y Tubulina (1/200). Incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Al concluir este tiempo se realizaron lavados para retirar los excesos y falsos positivos de Anticuerpo primario y posteriormente se incubó con anticuerpo secundario (1/2000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron lavados para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Por último se utilizó el Kit de revelado Millipore Luminol para identificar la expresión de las proteínas y se utilizó el equipo Versa Doc para revelar la membrana.

5.7. Inmunofluorescencias

Para analizar la expresión de las proteínas de interés, se realizó inmunofluorescencia de p52, p65, RelB, p50 y NIK. Brevemente, 5×10^5 células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con 0.1% de Triton durante 30 min. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se bloquearon con albumina 5% durante 1 hora y después se

incubaron con los anticuerpos primarios overnight a 4°C. Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 510).

5.8. Ensayos Clonogénicos

Para examinar la capacidad clonogénica de las células que sobreexpresan NIK se realizaron ensayos clonogénicos en agar suave. Brevemente, 1000 células individuales se colocaron en medio DMEM suplementado con 5% de suero y 0.3% de agarosa de bajo punto de fusión y se sembraron en placas de agar con 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión. Después de 40 días en cultivo, las colonias se tiñeron con 0.1% de cristal violeta y se contaron con el software ImageJ.

5.9. Ensayos de formación de tumores

Para determinar el potencial tumorigénico de las células que sobre-expresan NIK, se utilizaron 1×10^6 células, las cuales fueron inyectadas de manera subcutánea en ratones inmunodeficientes nu/nu hembras de 6 semanas. Los ratones fueron examinados cada semana para identificar la presencia del tumor. Después de 150 días, se midió el tumor con un vernier y se calculó el volumen del tumor mediante la siguiente fórmula: Volumen del tumor = (Diámetro más largo) X (Diámetro más corto)²/2.

6. Resultados

6.1. Digestión de Plásmidos

Para transfectar células MCF-7 con los plásmidos correspondientes, se amplificaron los plásmidos en bacterias DH5 α y posteriormente se realizaron maxi

preparaciones para obtener suficiente cantidad de vector para las transfecciones posteriores. Una vez extraída la cantidad de plásmido requerido, se determinó la identidad de los plásmidos mediante enzimas de restricción elegidas con base a los programas Mapper y NEBcutter V2.0, los cuales determinan el sitio de restricción en ambos vectores. Para digerir el plásmido pT-REx-DEST30-NIK se utilizaron las enzimas EcoRV y MLU1 y para el vector pT-REx-GW30-lacZ se utilizó BamHI y finalmente MLU1.

La digestión del vector pT-REx-DEST30-NIK con EcoRV y MLU1 genera dos fragmentos de 5208pb y 3577pb, lo cual concuerda con el mapa de restricción del plásmido.

La digestión del vector pT-REx-GW30-lacZ con MLU1 genera 4 fragmentos debido a que la enzima MLU1 reconoce 4 sitios de restricción dentro del plásmido. Los fragmentos generados son de 780pb, 425pb, 642pb y 7152pb. La digestión del vector con BAMH1 genera dos fragmentos de 5868pb y 3131pb debido a que solo existen dos sitios de restricción para esta enzima.

Los resultados de la digestión nos permitieron verificar la identidad de los plásmidos, ya que todos los fragmentos generados, corresponden con los sitios de restricción virtuales obtenidos con los programas antes mencionados.

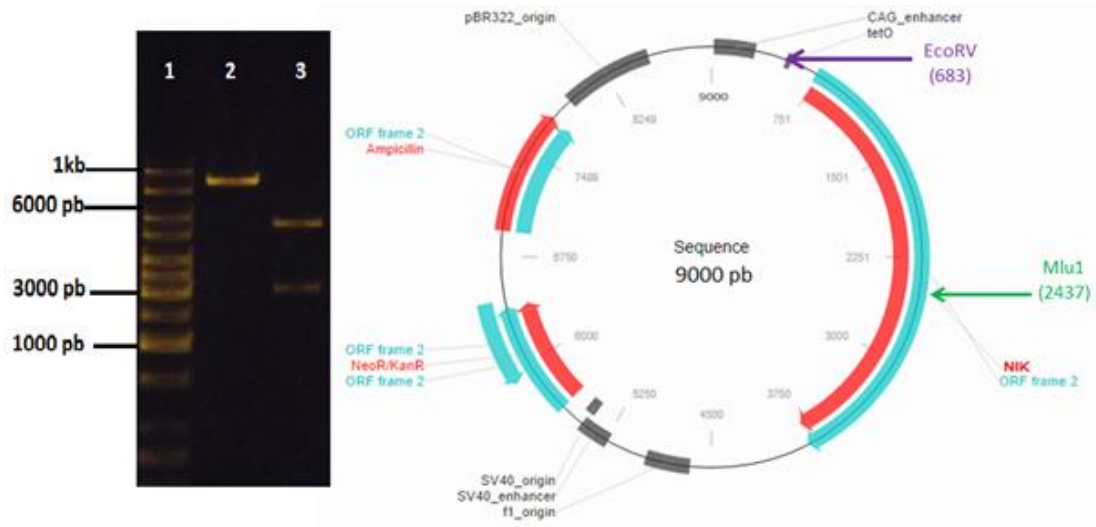


Figura 9. Digestión del plásmido +NIK. En 1) Marcador de peso, 2) Plásmido extraído con el Kit High Speed Maxi Prep (QIAGEN) 3) Digestión del Plásmido con la enzima EcoRV y Mlu1.

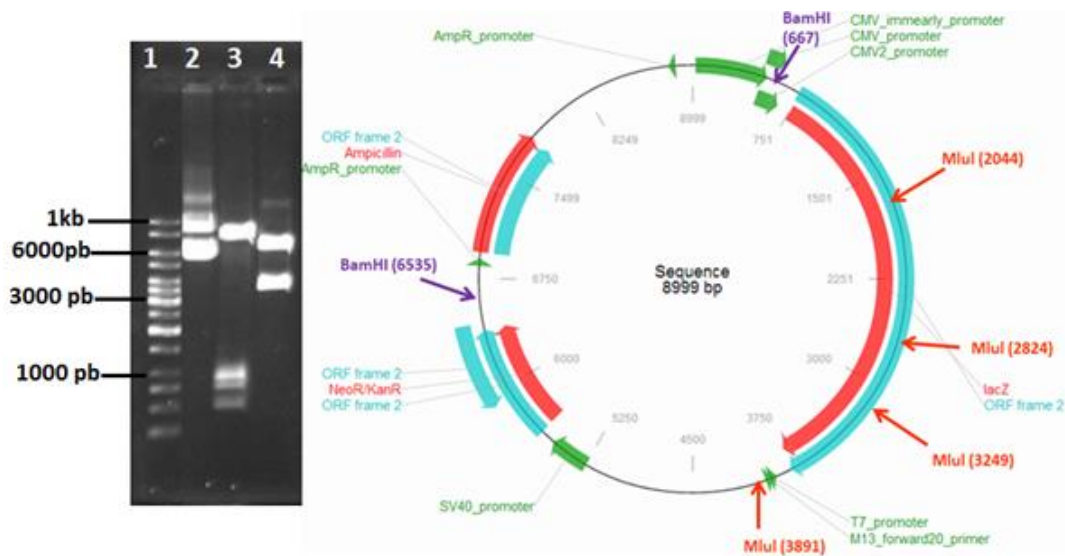


Figura 10. Digestión del Plásmido Control (LacZ). En 1) Marcador de Peso, 2) Plásmido extraído con el Kit High Speed Maxi Prep (QIAGEN), 3) Digestión del Plásmido con la Enzima Mlu1, 4) Digestión del Plásmido con la enzima BAMHI

6.2. Células transfectadas

Para llevar a cabo la sobre expresión de NIK en la línea celular MCF-7 se transfectaron las células en base al protocolo de Lipofectamina LTX (Invitrogen). Los plásmidos transfectados contienen secuencias de expresión para resistencia a G-418 por lo que fue necesario diseñar una curva de concentración de este antibiótico para determinar la concentración mínima que ocasione la muerte del 100% en células sin transfectar en 10 días. Mediante esta curva se determinó que una concentración de 100µg/ml provoca la muerte de las células que carecen del vector de interés, por lo que esta concentración de antibiótico facilitó la selección de las células que exitosamente adquirieron el plásmido. Después de 4 semanas de selección se obtuvieron líneas celulares estables que crecieron aun en presencia del antibiótico (Fig.11B) y se observó que las células control no transfectadas fueron sensibles al antibiótico y mueren separándose del sustrato. (Fig.11A)

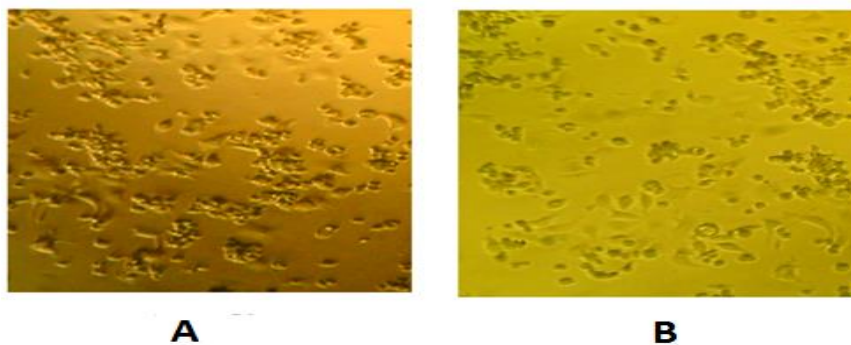


Figura 11.- Donde A se refiere a la imagen de las células MCF-7 control no transfectadas tratadas con 100µg/ml de G-418 y B se refiere a la imagen de las células MCF-7 transfectadas tratadas con 100µg/ml de G-418.

6.3. Sobre expresión de NIK en las células transfectadas

Para comprobar la sobre-expresión de NIK se extrajo ARN de las células transfectadas utilizando Trizol Reagent (Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la integridad del ARN, se corrió un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes (Fig. 12). En la figura podemos observar la presencia de dos bandas de 28s y 18s, además se observa que el RNA 28s es más abundante que el 18s por lo que podemos concluir que el ARN es íntegro. Así mismo la concentración y pureza de ARN se determinó mediante el uso de NanoDrop teniendo como resultado una concentración de 3983.2 ng/ μ l con una pureza de 1.83 para las células con el vector control y 5974.8 ng con una pureza de 1.84 para las células con el vector NIK+.

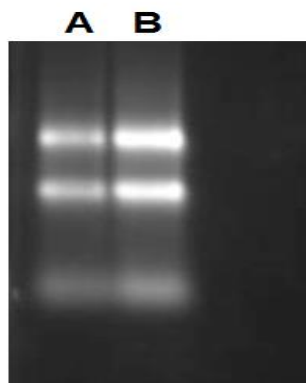


Figura 12. Electroforesis para comprobar la integridad del ARN extraído. En A se analizó a una concentración de 1 μ l = 3983.2 ng y en B a 1.5 μ l = 5974.8 ng.

Posteriormente se realizó el ensayo de RT-PCR usando 2000ng de ARN de las líneas transfectadas (MCF-7 +NIK y MCF-7 Control) utilizando el kit High Speed cDNA (Applied Biosystems) con la finalidad de retrotranscribir el ARNm y obtener ADNc. Posteriormente, 1 µl de ADNc obtenido de cada línea fue utilizado para llevar a cabo una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para NIK. Posteriormente analizamos la expresión del transcrito y comprobamos que en la línea celular transfectada con el vector NIK+ expresa mayores niveles de NIK en comparación con la línea celular transfectada con el vector Control (Fig.13). La línea estable NIK+ expresa 2.8 veces más NIK que la línea control.

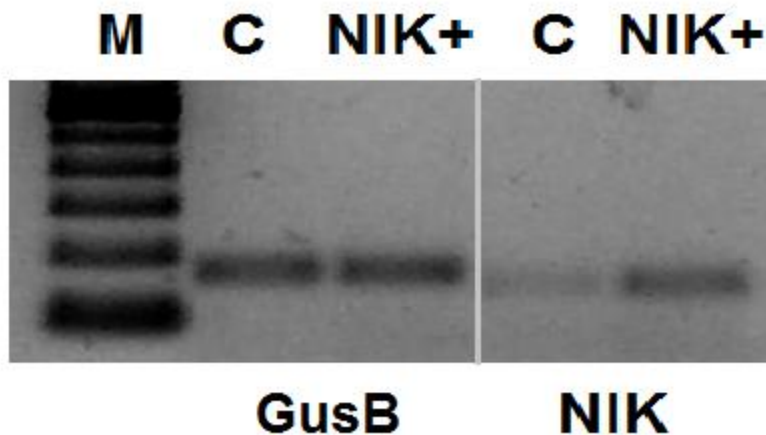


Figura 13. Análisis de productos de PCR de GUSB y NIK en Gel de Agarosa al 1.8% M- marcador de peso, C- células estables trasfectadas con el vector control, NIK+ -células estables transfectadas con el vector que contiene el ORF de NIK. Este ensayo se repitió en 3 ocasiones posteriores arrojando el mismo resultado.

Para verificar que el pase celular no alteró el efecto de sobre-expresión en las líneas celulares, se extrajo RNA de pase 1, 2, 3 y 4 y se determinó la expresión de NIK mediante PCR. Los resultados nos indican que las células de pase 4 siguen sobre-expresando NIK, por lo que decidimos usar pase 3 para todos los experimentos (Fig.14).

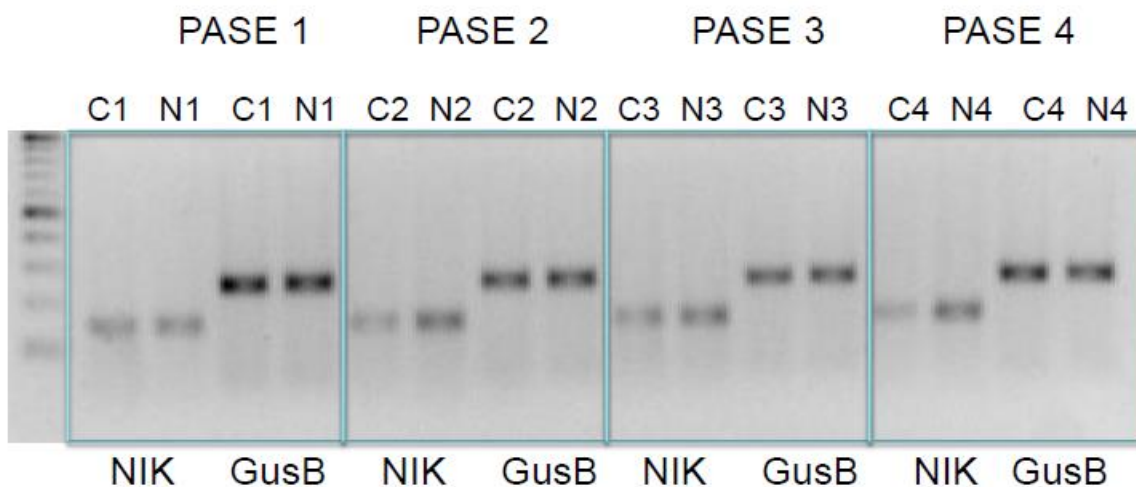


Figura 14. PCR para NIK en distinto pases celulares donde C1, 2, 3 y 4 corresponden a los ensayos con el Vector Control. En N1, 2, 3 y 4 ensayos PCR para NIK con el Vector NIK+.

6.4. Western Blot

Para comprobar que la expresión de NIK activa los factores NF- κ B, se extrajeron proteínas citosólicas y nucleares de las células transfectadas con el fin de detectar la expresión de proteínas involucradas tanto en la vía canónica así como, en la vía no canónica. La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante

el método de Western Blot que consistió en la transferencia de proteínas tanto nucleares como citosólicas para reconocer a p52, p65, RelB, tubulina y nucleolina (Fig. 15). De manera interesante, los resultados obtenidos muestran que al sobreexpresar NIK, la expresión de RelB, p52 y p65 muestra un incremento en su expresión a nivel nuclear, esto, con respecto a las proteínas de las células control (Fig. 16). Mientras que el extracto proteico citosólico se observa que mantienen un comportamiento similar entre ambas líneas (NIK+ y Control). Por lo que podemos suponer que la expresión de NIK juega un papel muy importante para la activación de ambas vías de NF- κ B.

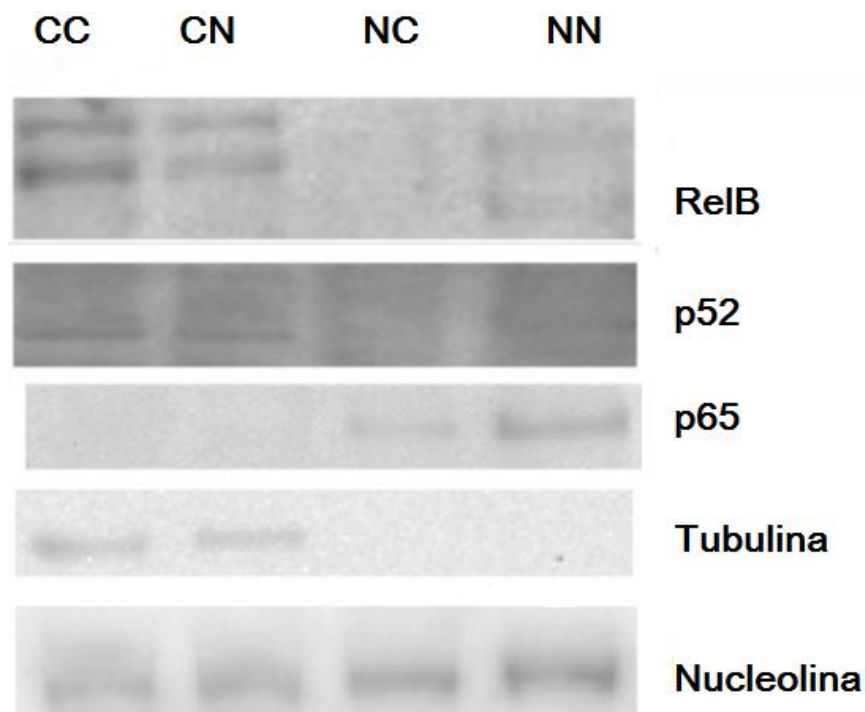


Figura 15. Western Blot para p52, RelB y p65. En CC proteínas citosólicas de células control. CN= proteínas citosólicas de células NIK+. NC= Proteínas nucleares extraídas de células control. NN= proteínas nucleares de células NIK+.

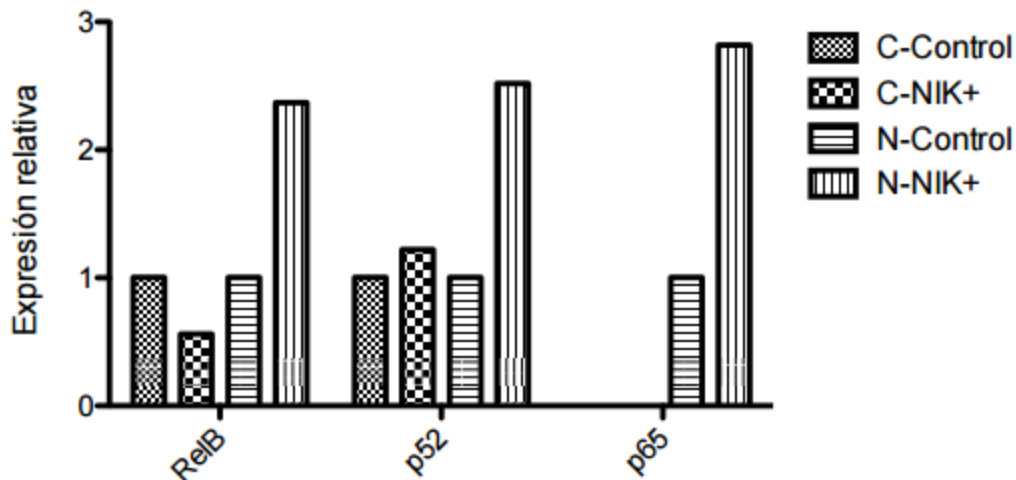


Figura 16. Densitometría del Western Blot contra RelB, p52 y p65.

6.5 Características de las líneas estables

De manera interesante, se observó que las células estables que sobre-expresan NIK presentan características morfológicas muy distintas a las células transfectadas con el vector Control. Las células NIK+ poseen una morfología más alargada en comparación con las células Control, estas células poseen una morfología tipo mesenquimal, mientras que las células control presentan un fenotipo epitelial (Fig.17). El cambio en la morfología observada se asemeja a células que han experimentado una transición epitelio mesénquima, recientemente se ha demostrado que la TEM genera células tipo troncales que pueden auto-renovarse y/o diferenciar en otras células cancerosa. De manera interesante, en la línea luminal MCF-7, la cual presenta bajos niveles de NIK, probablemente al

sobre expresar o forzar la expresión de NIK se induzca a una morfología mesénquimal característica de las líneas basales como la línea de cáncer de mama MDA-231.

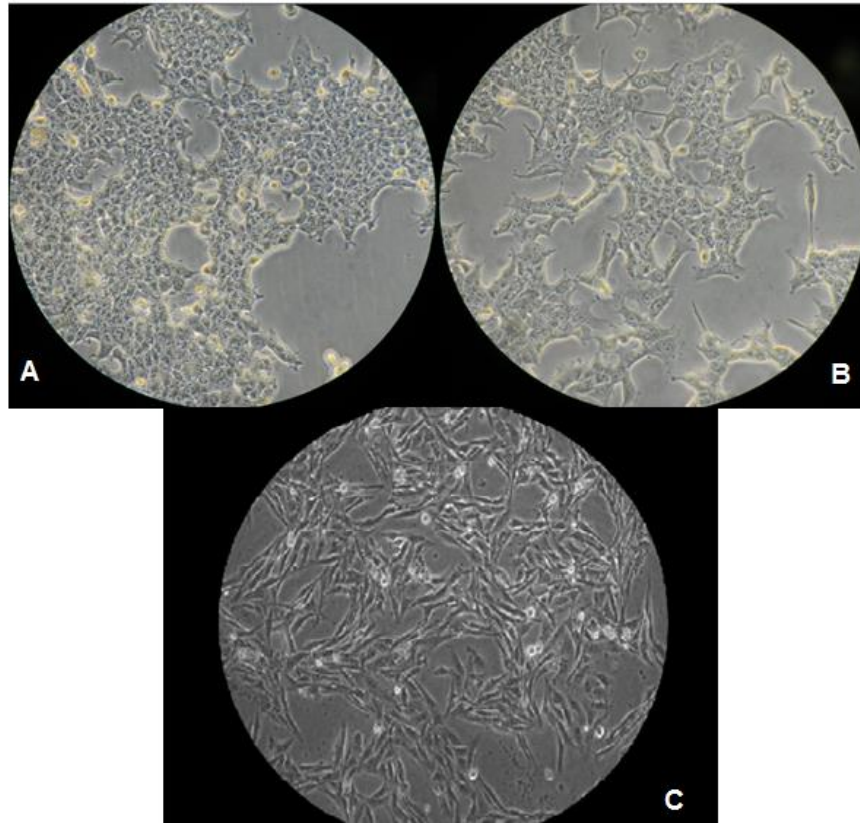


Figura 17. Cultivos celulares a través de microscopio a 40X. En A células transfectadas con el vector control pT-REx/GW-30/lacZ. En B células transfectadas con el vector pT-REx/DEST-30/NIK. En C células MDA231, células de cáncer de mama de tipo basal.

6.6. Análisis de Marcadores de fenotipo tumorigénico.

Para determinar si existe la posibilidad de que las células transfectadas con el Vector NIK+ expresen genes de CTC o genes asociados con la TEM realizamos ensayos de PCR mediante el protocolo anteriormente detallado. De manera interesante los resultados demostraron que al sobreexpresar NIK ocurre un incremento en la expresión de los genes NANOG y SOX2, los cuales son factores de transcripción involucrados en la auto-renovación y multipotencia de las CTC. Por el contrario, el gen MUC-1 está disminuido en las células que sobre-expresan NIK. MUC-1 está asociado a células epiteliales diferenciadas y se encuentra ausente en CTC.

Por otra parte, los genes SNAIL y Vimentina, los cuales están involucrados en la transición epitelio mesénquima también presentaron una pequeña sobre expresión en las células NIK+ con respecto a las células control, de igual forma, el gen CXCR4 se demostró una ligera sobre expresión en las células que sobre expresan NIK (Figs.18 y 19). Cabe mencionar que el gen CXCR4 es un gen blanco de la vía de NF-kB además de estar asociado a motilidad y a la proliferación de las células cancerosas en sitios metastásicos específicos.

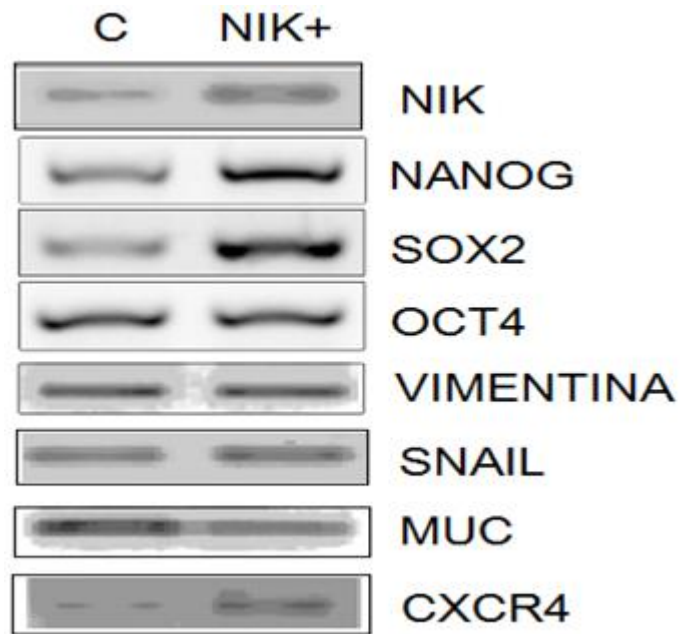


Figura 18. PCR de marcadores asociados a CTC y TEM. En C PCR de células control, a la derecha, PCR de células NIK+.

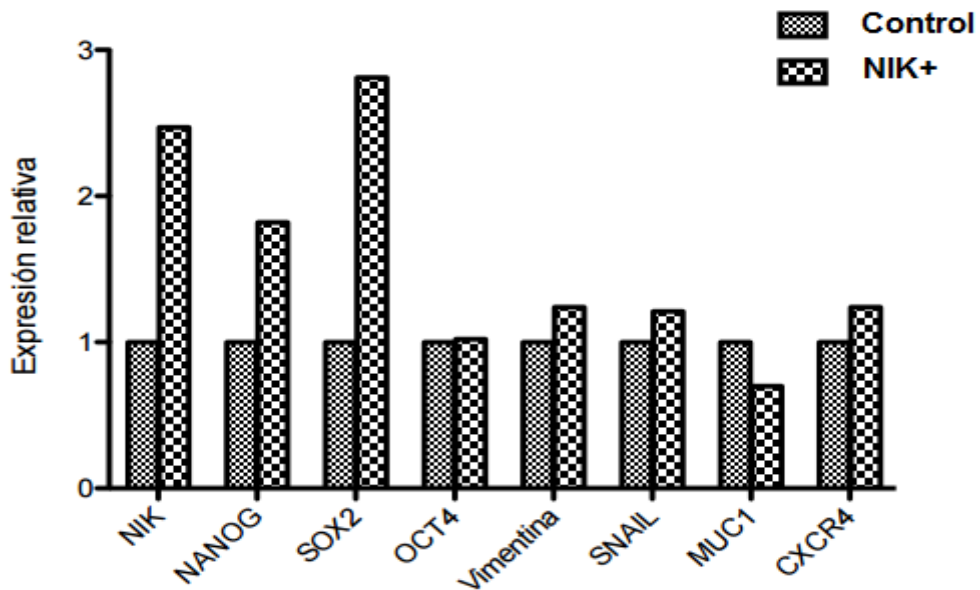


Figura 19. Densitometría de PCR de marcadores tumorigénicos expresados en las células control y NIK+.

6.7. Ensayo de clonogenicidad

Debido a que las CTC poseen una mayor capacidad de generar colonias, se analizó la capacidad clonogénica de las células que sobreexpresan NIK por lo que se realizaron ensayos clonogénicos en agar suave colocando 1000 células en medio DMEM suplementado y en las condiciones reportadas en la sección de método. De manera interesante, las células transfectadas con el Vector NIK+ desarrollaron un mayor número de colonias así como un mayor tamaño de estas mismas, con respecto a las células transfectadas con el vector control (Fig. 20 y 21)

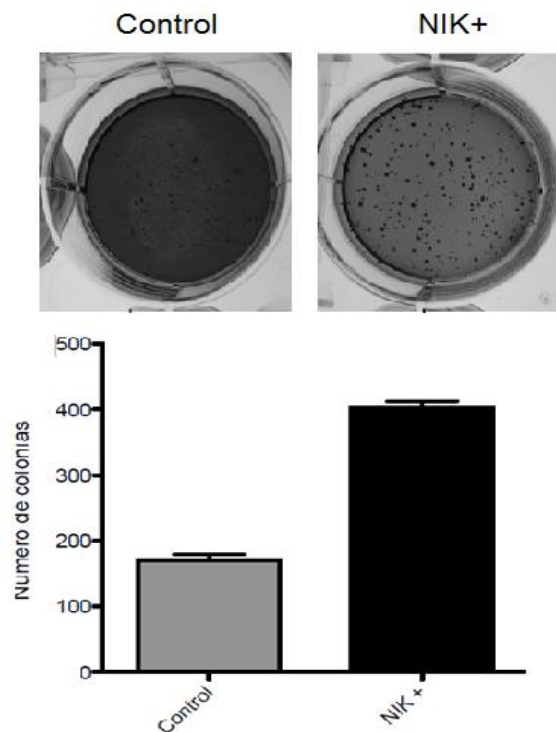


Figura 20. Clonogenicidad de células control y de células NIK+.

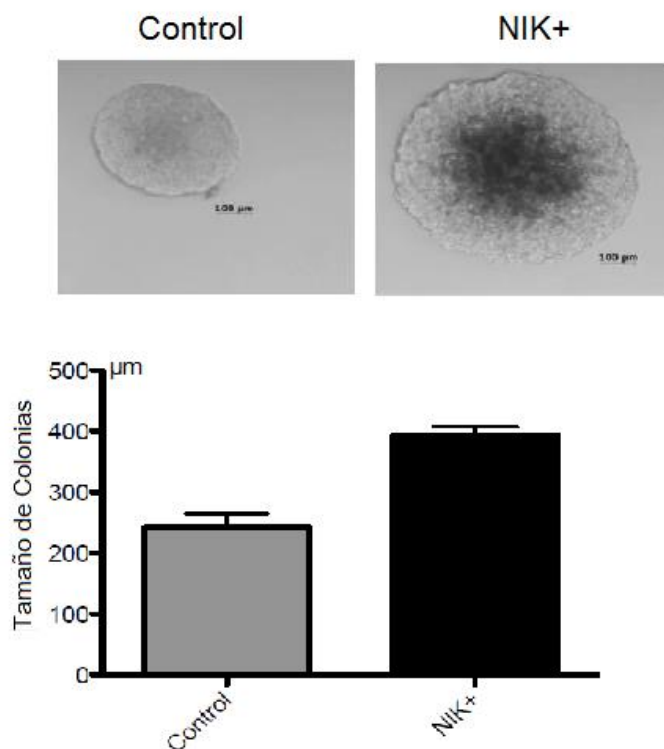


Figura 21. Las colonias formadas por las células que sobreexpresan NIK son de mayor tamaño que las colonias formadas por las células control, esto se observa de manera cualitativa y cuantitativa como muestra la figura. La grafica muestra el promedio de 3 experimentos, *pvalue* = 0.0013 por lo que los valores obtenidos son estadísticamente significativos.

Estos resultados sugieren que las células que sobre-expresan NIK probablemente poseen un mayor número de CTC y por ende una mayor clonogenicidad.

6.8. Ensayo tumorigénico

Cabe mencionar que una de las principales características de las CTC es la capacidad de formar tumores cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes. Para determinar si las células NIK+ pueden adquirir un comportamiento semejante

a las CTC, se inyectaron de manera subcutánea 1×10^6 células a ratones inmunodeficientes nu/nu hembras de 6 semanas. Se examinaron cada semana durante 2 meses en las condiciones indicadas por el bioterio. El grupo de ratones a los que se les injertaron células con el Vector Control solo 1 de 5 mostró una pequeña tumoración, el resto no mostraron generación o presencia de algún tumor durante el tiempo de observación. En contraste, el grupo de ratones a los que se les injertaron células con el Vector NIK+, 3 de 5 ratones mostraron generación tumoral. Posteriormente al medir el volumen de los tumores, determinamos que los tumores generados por las células con el vector NIK+ tienen un mayor volumen con respecto a los tumores generados por las células con el Vector Control.

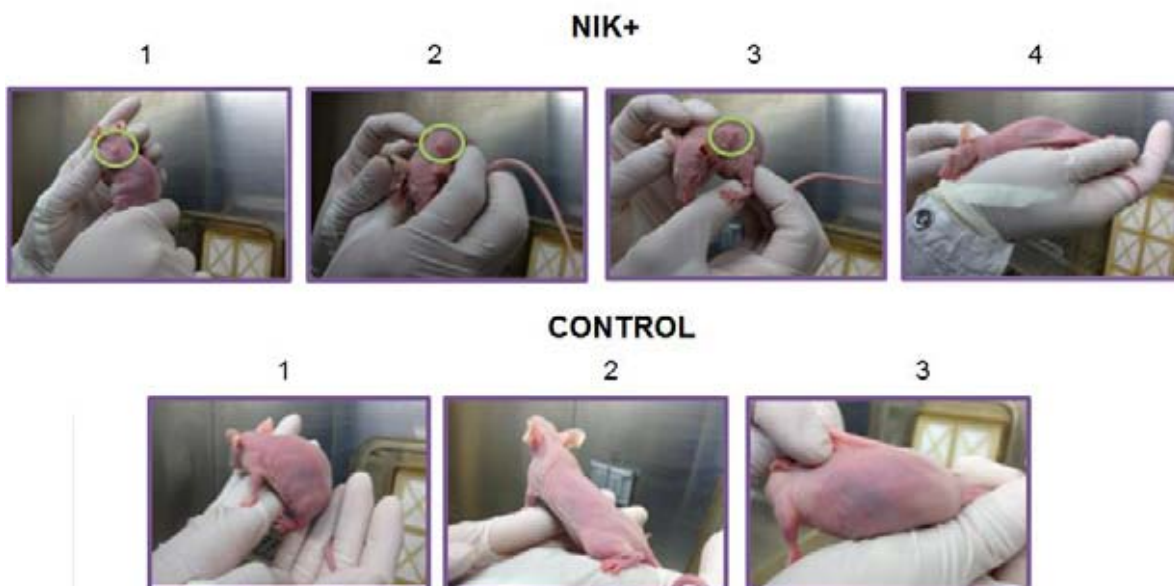


Figura 22. Crecimiento tumoral en ratones inmunodeficientes. En ambos grupos se observan para NIK+ solo 4 de 5 casos y en el grupo Control solo 3 de 5 casos ya que los ratones faltantes murieron durante el proceso. Tres de los 4 ratones transplantados con las células NIK+ formaron tumores con un

volumen semejante, mientras que los ratones inyectados con las células control solo formaron 1 tumor de un tamaño muy pequeño.

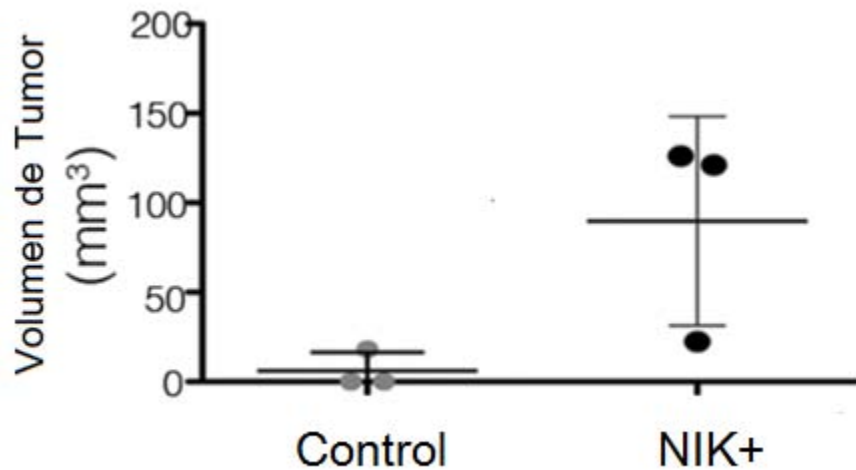


Figura 23. Descripción cuantitativa de los tumores generados.

7. Discusión de Resultados

NIK juega un papel muy importante en el desarrollo, mantenimiento y progresión del cáncer, principalmente a través de la activación de los factores de transcripción NF- κ B. Los genes implicados en la vía, como son, p52, RelB y p65 han sido asociados a procesos inflamatorios, respuesta inmune y cáncer. Particularmente, el gen p52 se ha observado sobre expresado en diversos tipos de cáncer principalmente en cáncer de mama y colon (32). Los resultados obtenidos muestran una mayor expresión de las proteínas p52, RelB y p65 en las células que sobre-expresan NIK con respecto a las control, por lo que podemos suponer que la sobre-expresión de NIK incrementa la actividad de la vía NF- κ B. Estudios

previos han relacionado la expresión de NF- κ B con la malignidad del cáncer de Mama y han determinado que el cáncer de mama de tipo basal tiene una mayor actividad de NF- κ B, la cual provoca un incremento en la proliferación celular (2).

Las líneas de cáncer de tipo luminal expresan niveles muy bajos de moléculas de la vía de NF- κ B y tienen poca actividad de NF- κ B. La línea celular MCF-7 es una línea luminal con características epiteliales y con baja expresión de NIK. Sorprendentemente, la sobreexpresión de NIK en MCF-7 provoca un cambio en la morfología de las células, observándose una morfología similar a la de las células mesénquimales. Se sabe que las células epiteliales pueden perder ciertas características como la adhesión célula-célula y la polaridad apico-basal adquiriendo características mesenquimales. Las células mesenquimales pueden desarrollar capacidad de invasión, movilidad y resistencia a apoptosis. Este proceso es denominado Transición Epitelio Mesénquima (TEM). La TEM es un proceso molecular y celular que se presenta durante el desarrollo embrionario y está asociado a algunos procesos patológicos como el Cáncer. Las células que han experimentado una transición epitelio mesénquima presentan una morfología mayormente alargada. Esto es debido a que durante la TEM los elementos del citoesqueleto son reorganizados y el citoesqueleto periférico de actina es reemplazado por fibras de estrés, mientras que los filamentos intermedios de citoqueratina son reemplazados por Vimentina (33). De manera interesante, observamos que la sobre-expresión de NIK provoca un ligero incremento en la expresión de Vimentina, por lo que para ser biológicamente relevante tendría que replicarse el experimento. Estos resultados sugieren que NIK puede regular la

TEM mediante la expresión de genes asociados a células mesenquimales, otorgando características mesenquimales a células con un fenotipo epitelial. Otro gen involucrado en la TEM es el gen Snail, este gen es un inductor de la TEM debido a que inhibe la expresión de E-cadherina y ocasiona la pérdida de la adhesión intercelular (34). De manera interesante, observamos que la sobreexpresión de NIK también provoca un aumento en la expresión de SNAIL, este gen es un inductor de la migración e invasión de las células cancerosas, por lo que podemos suponer que la expresión de NIK puede favorecer la TEM y fomentar la migración de las células cancerosas. Por otra parte, se sabe que Snail también puede inhibir la expresión del gen MUC-1. La principal función de MUC-1 en células normales es recubrir la superficie apical de las células epiteliales (34). De manera interesante, NIK provoca una disminución de la expresión de MUC-1, estos resultados sugieren que NIK puede promover que las células MCF-7 pierdan sus características epiteliales. Estos resultados sugieren que NIK probablemente pueda regular la expresión de genes involucrados en la TEM modificando o alterando el fenotipo celular transformando a células epiteliales en células con características mesénquimales.

La TEM es un evento importante para la propagación del cáncer debido a que facilita la migración e invasión de las células cancerosas (35). Recientemente se ha descrito que la inducción de la TEM genera células con propiedades similares a las células troncales cancerosas (CTC). Las CTC son una población de células presentes en la mayoría de los tumores. Estas células son las responsables de la progresión y mantenimiento del cáncer. Las CTC presentan una gran capacidad

de auto renovación y son capaces de formar diferentes tipos celulares que conforman un tumor. Las CTC expresan factores de transcripción asociados con pluripotencia, los cuales, facilitan la auto-renovación (NANOG, SOX2 y Oct4) y mantienen el estado indiferenciado de las células. En cáncer, se sabe que la expresión de estos genes está directamente relacionado con la agresividad de la neoplasia (36). Interesantemente, observamos que la expresión forzada de NIK provoca un incremento en la expresión de NANOG y SOX2 en comparación con su expresión en las células control, por lo que tal vez pudiese tener cierta importancia biológica de repetirse este ensayo, ya que en el caso de SOX2 la expresión de este se observa casi duplicada con respecto a las células control. Otro gen que ha sido reconocido como marcador en diversos tipos de cáncer además de estar relacionado a CTC, es el gen CXCR4, este gen está involucrado en la migración celular, metástasis, progresión y diseminación del cáncer, en especial en tipos de cáncer de mama, pulmón y linfomas (37). Al observar los resultados se determinó que la expresión de este gen probablemente se encuentre relacionada con la expresión de NIK puesto que al sobre expresarlo, se observó un ligero incremento en la expresión de CXCR4. De igual manera, habría que replicar este ensayo para obtener una importancia biológica. Por lo anterior podemos suponer que la expresión forzada de NIK puede contribuir a la generación de células con características fenotípicas semejantes a las CTC.

Una de las principales características de las CTC es la clonogenicidad. Esta propiedad es vital para la proliferación celular así como para la formación de tumores. Por tal motivo, se analizó el potencial clonogénico de las células que

sobreexpresan NIK, de manera interesante, la sobreexpresión de NIK aumenta la capacidad clonogénica de las células MCF-7 observándose un incremento en el número y el tamaño de las colonias. Se ha reportado que las células con una mayor capacidad clonogénica tienden a ser mayormente invasivas, presentan características de un linaje más agresivo y además poseen una mayor población de CTC.

Nuestros resultados muestran que la expresión de NIK juega un papel muy importante en el mantenimiento de las células de cáncer de mama y facilita la adquisición de características de CTC. Es importante puntualizar que una de las características primordiales de las CTC es la capacidad de formar tumores cuando estas se trasplantan en ratones inmunodeficientes (38). Por este motivo, se analizó el potencial tumorigénico de las células que sobreexpresan NIK y las células MCF-7 control. Los resultados muestran que las células control solo formaron un tumor en 1 de los 4 ratones trasplantados, mientras que las células que sobre-expresan NIK formaron tumores en 3 de los 4 ratones trasplantados. Estos resultados sugieren que NIK puede inducir características de células troncales cancerosas. Evidencias recientes sugieren que la vía de señalización NIK/IKK α es fundamental para la expansión de células troncales. NIK/IKK α promueven la auto-renovación de las células troncales y favorecen la tumorigénesis (39).

Además se ha propuesto que la actividad de NF- κ B puede regular la población de CTC en células de cáncer de mama de tipo basal mediante la regulación del gen JAG1 involucrado en el desarrollo embrionario. Se demostró que la activación de

NF- κ B incrementa la población de células troncales (CD24-/CD44+)(22,40). De manera interesante, nuestros resultados mostraron que las células con una mayor expresión de NIK pueden desarrollar mayor número y tamaño de colonias en contraste con las células control.

Por lo que tanto, la expresión de NIK puede conferir propiedades de células troncales cancerosas en la línea de cáncer de mama MCF-7, posiblemente a través de la vía no canónica de NF- κ B.

8. Conclusión

La expresión forzada de NIK en células MCF-7 induce la expresión de genes implicados en la tumorigenesis y en la transición epitelio mesenquima probablemente mediante la activación de la vía no canónica. Así mismo, la sobre expresión de NIK puede provocar un incremento en la expresión de algunos genes característicos de células troncales como son CXCR4, NANOG y SOX2; sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos por los cuales NIK repercute en la expresión de estos genes y determinar que vías están implicadas en estos procesos. La expresión forzada de NIK promueve el potencial clonogénico y tumorigénico de las células MCF-7. Además, los tumores formados por la línea que sobreexpresa NIK fueron de mayor volumen que los tumores formados por la línea control. Por lo tanto, consideramos que NIK juega un papel muy importante en el mantenimiento del cáncer en las células MCF-7 y podría considerarse como un marcador tumorigénico en un futuro, de demostrarse la importancia biológica de este.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):10137–42.
2. Jiao X, Wood LD, Lindman M, Jones S, Buckhaults P, Polyak K. Somatic Mutations in the Notch , NF-KB , PIK3CA , and Hedgehog Pathways in Human Breast Cancers. 2012;000(December 2011):1–10.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics , 2008. 2009;(November 1950).
5. Del EAP. DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA. 2015;1–15.
6. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, et al. across breast cancer subtypes. 2012;6–10.
7. Eroles P, Bosch A, Pérez-fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer : Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;38(6):698–707. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
8. Irigoyen MAA. Subtipos moleculares del cáncer de mama : implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas Molecular subtypes of breast cancer : prognostic implications. 2011;219–33.
9. Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, et al. Epigenetic alteration of the NF-κB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2010;101(11):2391–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735436>
10. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. 2010;
11. Zarnegar B, Yamazaki S, He JQ, Cheng G. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3503–8.
12. Habib AA, Chatterjee S, Park S-K, Ratan RR, Lefebvre S, Vartanian T. The Epidermal Growth Factor Receptor Engages Receptor Interacting Protein and Nuclear Factor- B (NF- B)-inducing Kinase to Activate NF- B: IDENTIFICATION OF A NOVEL RECEPTOR-TYROSINE KINASE

- SIGNALOSOME. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(12):8865–74. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M008458200>
13. Nishina T, Yamaguchi N, Gohda J, Semba K, Inoue J. NIK is involved in constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway and proliferation of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;388(1):96–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646419>
 14. Smale ST. Celebrating 25 years of NF- κ B. *Nat Immunol* [Internet]. 2011;12(8):681. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169328/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772274>
 15. Muscolini M, Sajeve A, Caristi S, Tuosto L. A novel association between filamin A and NF- κ B inducing kinase couples CD28 to inhibitor of NF- κ B kinase λ and NF- κ B activation. *Immunol Lett*. 2011;136(2):203–12.
 16. Sun S. The noncanonical NF- κ B pathway. 2012;(4):125–40.
 17. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* [Internet]. 2006;25(51):6680–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1209954>
 18. Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, et al. NF- κ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- κ B, Contributes to Ovarian Cancer Progression. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(2):e88347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533079>
 19. Sun S. N F - κ B S I G N A L I N G Controlling the Fate of NIK : A Central Stage in Noncanonical NF- κ B Signaling. 2010;3(May):2008–11.
 20. Qing G, Qu Z, Xiao G. Stabilization of basally translated NF- κ B-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF- κ B2 p100. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40578–82.
 21. Liou G, Storz P. Downregulation of TRAF2 Mediates NIK-Induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Tumorigenicity. 2013;8(1).
 22. Yamamoto M, Taguchi Y, Ito-Kureha T, Semba K, Yamaguchi N, Inoue J. NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4:2299. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934482>
 23. Thu YM, Su Y, Yang J, Splittgerber R, Na S, Boyd a, et al. NF- κ B inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway. *Oncogene* [Internet]. 2012;31(20):2580–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3253179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Ling L, Cao Z, Goeddel D V. NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α

- by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3792–7.
25. Chung S, Sundar IK, Hwang JW, Yull FE, Blackwell TS, Kinnula VL, et al. NF- κ B inducing kinase, NIK mediates cigarette smoke/TNF α -induced histone acetylation and inflammation through differential activation of IKKs. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(8):e23488. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Thu YM, Richmond a. NF- κ B inducing kinase: A key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;21(4):213–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.06.002>
 27. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. of Evolutionary Conserved , NF- κ B Signaling Pathway. 2008;293(5534):1495–9.
 28. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, et al. Overexpressed NF- κ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* [Internet]. 2008;111(10):5118–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305221>
 29. Rosebeck S, Madden L, Jin X, Gu S, Apel IJ, Appert A, et al. Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF- κ B activation. *Science* [Internet]. 2011;331(6016):468–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3124150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 30. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* [Internet]. 2007;12(2):115–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610807002036>
 31. Yamaguchi N, Ito T, Azuma S, Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, et al. Constitutive activation of nuclear factor- κ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. 2009;100(9).
 32. Xiao G, Fong A, Sun SC. Induction of p100 processing by NF- κ B-inducing kinase involves docking I κ B kinase γ (IKK γ) to p100 and IKK γ -mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30099–105.
 33. Manuscript A. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. 2014;15(3):178–96.
 34. Kalluri R, Weinberg R a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–8.

35. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2011;9(12):1608–20. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568>
36. Wei L, Liu T, Wang H, Hong H, Yu AL, Feng H, et al. Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor- β . 2011;(110):1–13.
37. Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. 2013;3(1):46–57.
38. Montgomery N, Hill A, Mcfarlane S, Neisen J, Grady AO, Conlon S, et al. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;14(3):R84. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/14/3/R84>
39. Zhang W, Tan W, Wu X, Poustovoitov M, Strasner A, Li W, et al. A NIK-IKK α Module Expands ErbB2-Induced Tumor-Initiating Cells by Stimulating Nuclear Export of p27/Kip1. *Cancer Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;23(5):647–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.012>
40. Shostak K, Chariot A. NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):214.