



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**Inhibición del gen *CBFB* mediante CRISPR-Cas9**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**IXCHEL MARITRINI SALGADO CARRANZA**

**Asesora**

**Dra. Magali Espinosa Castilla**

**Co-asesora interna**

**Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del  
Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la  
Dra. Magali Espinosa Castilla.

## AGRADECIMIENTOS

---

De forma muy especial, agradezco a mis padres por regalarme la vida, por llenarme de amor, apoyarme incondicionalmente y enseñarme en todo momento. Por que sin ustedes yo no sería la persona que soy, ni podría culminar esta importante etapa de mi vida. Los amo para siempre.

A mis hermanos, por estar a mi lado en los mejores y peores momentos, por ser mi apoyo y cómplices no solo en esta etapa, sino en cada momento de mi vida. Gracias por aceptarme como soy y permitirme aprender de cada uno cosas que me definen como persona.

A mis tíos (Beny y Jesús) y a mis primos (Ana, Metzi y Armando), por abrirme las puertas de su casa a lo largo de este proceso. Gracias por procurarme y tratarme siempre como parte de su familia.

A la Dra. Magali, por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado y desarrollar este proyecto. Le agradezco todas sus enseñanzas académicas y de vida, su confianza y apoyo en todo momento. Porque a pesar de solo ser su alumna, siempre se preocupó por mi bienestar en todos los sentidos. Gracias por ser más que mi tutora.

A la Dra. Sandra, por guiarme y apoyarme durante todo el proceso de titulación. Le agradezco el tiempo para supervisar todo y la disposición para aclarar mis dudas. Gracias por el conocimiento transmitido en todas sus clases, es una excelente profesora.

A jaz, una gran amiga, que a pesar de la distancia estuvo presente en cada momento de este camino y nunca soltó mi mano cuando lo necesité. Gracias por tu apoyo y por levantarme y animarme a continuar siempre.

A mis amigos de la facultad, por ser mis compañeros a lo largo de este camino llamado "Universidad". Porque durante esos cuatro años llenos de tareas y responsabilidades, me colmaron de risas y buenos momentos. Gracias a ustedes no me sentí sola aún estando lejos de mi hogar. Gracias Rebeca y Arely por ser mi súper equipo y por compartirme tanto. Gracias Alejandra por compartir no solo la escuela, sino también nuestra casa, días y noches de desvelo inolvidables.

A mis amigos del laboratorio, por hacer tan feliz mi estancia en el instituto. Gracias por amenizar los días de trabajo con tantas ocurrencias y "chismes", por compartir parte de sus vidas conmigo y dejarme compartir la mía con ustedes, por el apoyo con los problemas

de laboratorio y de todo tipo. Gracias Ale, Lib, Alex, Benji, Adàn, Fer, Ela y Aaròn. Gracias Manuel por enseñarme tanto profesionalmente y como persona, por apoyarme dentro y fuera del laboratorio, aprendí mucho de ti.

Al Dr. Jorge Meléndez, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y permitirme realizar este proyecto.

A los profesores de mi jurado, por el tiempo y dedicación para la revisión esta tesis, gracias por su apoyo y por enriquecer este trabajo.

A la UNAM y especialmente a la FES Cuautitlán, por abrirme sus puertas y ser no solo una escuela, sino un hogar para mi. Dentro de ella tuve excelentes profesores, a los cuales les agradezco infinitamente el conocimiento compartido y consejos, que me han servido y sé que me servirán en mi vida profesional y personal.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

<b>a.a</b> - Aminoácidos	<b>HRP</b> - Peroxidasa de rábano
<b>AML</b> - Leucemia mieloide aguda	<b>min</b> - minutos
<b>BRCA</b> - <i>Breast cancer gene</i> , gen de cáncer de mama.	<b>mRNA</b> - RNA mensajero
<b>CaMa</b> -Cancer de mama	<b>MTS</b> - Esferoides tumorales multicelulares
<b>CBF</b> - <i>Core Binding Factor</i> , Factor de unión al núcleo	<b>NHEJ</b> - Reparación por unión de extremos no homólogos
<b>CBFA</b> - <i>Core Binding Factor A</i> , Factor de unión al núcleo subunidad A	<b>n</b> - tamaño de la muestra
<b>CBFB</b> - <i>Core Binding Factor B</i> , Factor de unión al núcleo subunidad B	<b>nm</b> - nanómetro
<b>CRISPR</b> - <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas regularmente	<b>PBS</b> - Buffer fosfato salino
<b>Cas9</b> - <i>CRISPR Associated Protein 9</i> , proteína 9 Asociada a CRISPR.	<b>PCR</b> - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>cdNA</b> - DNA complementario	<b>PR</b> - Receptor de progesterona
<b>DBS</b> - <i>Double break strain</i> , ruptura de doble cadena	<b>PuroR</b> - Resistencia a puromicina
<b>DNA</b> - Ácido desoxirribonucleico	<b>PVDF</b> - Fluoruro de polivinilideno
<b>dpi</b> - Días post-inyección	<b>RFLP</b> - Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
<b>EGFR</b> - Factor de crecimiento epidérmico	<b>RDH</b> - Dominio de homología de runt
<b>ER</b> - Receptor de estrógenos	<b>RNA</b> - Ácido rubonucleico
<b>GAPDH</b> - Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	<b>rpm</b> - Revoluciones por minuto
<b>GFP</b> - Proteína verde fluorescente	<b>SD</b> - Desviación estándar
<b>gDNA</b> - DNA genómico	<b>SFB</b> - Suero fetal bovino
<b>h</b> - Horas	<b>sgRNA</b> - RNA guía
<b>HDR</b> - Reparación mediada por homología	<b>TBS</b> - Buffer Tris salino
<b>HER-2</b> - receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano	<b>TCGA</b> - <i>The Cancer Genome Atlas</i> , atlas del genoma del cáncer.
<b>hpf</b> - Horas post-fertilización	<b>WB</b> - Western blot
	<b>°C</b> - grados Celsius
	<b>KDa</b> - Kilo Daltons
	<b>µm</b> - micrómetro
	<b>λ</b> - longitud de onda

## ÍNDICE

---

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1. Cáncer y sus características</b> .....	3
1.1 Desarrollo tumoral.....	4
1.2 Epidemiología del cáncer.....	5
<b>2. Cáncer de mama</b> .....	6
2.1 Clasificación.....	7
<b>3. Factores de unión al núcleo (CBFs)</b> .....	8
3.1 Factor de unión al núcleo A (CBFA) o proteínas RUNX.....	8
3.1.1 RUNX y cáncer.....	9
3.2 Factor de unión al núcleo B (CBFB).....	11
3.2.1 CBFB y cáncer.....	12
<b>4. CRISPR-Cas9 y la edición del genoma</b> .....	13
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	17
1. Objetivo general.....	17
2. Objetivos particulares.....	17
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
Líneas celulares.....	18
Cultivo celular en monocapa y criopreservación.....	18
Inhibición de <i>CBFB</i> por el sistema CRISPR-Cas9/Transfección de células en monocapa .....	19
Selección de células con transfección y ejecución de sistema CRISPR-Cas9 exitosos a partir de gen reportero.....	20
Extracción de proteínas totales.....	20
Western Blot (WB).....	20
Densitometría.....	21
Técnica de cristal violeta.....	21
Proliferación celular.....	21
Clonogenicidad.....	21
Formación de esferoides tumorales.....	21
Xenotransplante en embriones de pez cebra.....	22
Análisis estadístico.....	22

VIII. RESULTADOS.....	23
Inactivación de <i>CBFB</i> en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468.....	23
Evaluación de la inactivación de <i>CBFB</i> por WB.....	23
Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de la inhibición de <i>CBFB</i> .....	25
Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de la inhibición de <i>CBFB</i> .....	31
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
X. CONCLUSIONES.....	39
XI. PERSPECTIVAS.....	40
XII. REFERENCIAS.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

Figura 1. Características del cáncer.....	3
Figura 2. Desarrollo tumoral.....	4
Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en México.....	5
Figura 4. Esquema anatómico-histológico de la glándula mamaria.	6
Figura 5. Esquema de la estructura de las proteínas RUNX.....	9
Figura 6. Esquema de la estructura de <i>CBFB</i> .....	12
Figura 7. Mecanismo de edición génica mediada por CRISPR-Cas9	14
Figura 8. Esquema general de la metodología .....	18
Figura 9. Mecanismo de inactivación de <i>CBFB</i> por el sistema CRISPR -Cas9.....	19
Figura 10. Evaluación de la inactivación de <i>CBFB</i> con sistema CRISPR -Cas9 por WB .....	24
Figura 11. Efecto de la inactivación de <i>CBFB</i> sobre la proliferación de las células MCF-7.....	26
Figura 12. Efecto de la inactivación de <i>CBFB</i> sobre la proliferación de las células MDA-MB-468.....	27
Figura 13. Efecto de la inactivación de <i>CBFB</i> sobre la capacidad clonogénica de las células MCF-7.....	28
Figura 14. Efecto de la inactivación de <i>CBFB</i> sobre la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-468.....	29
Figura 15. Efecto de la inhibición de <i>CBFB</i> sobre el crecimiento de esferoides multicelulares MCF-7.....	30
Figura 16. Efecto de la inhibición de <i>CBFB</i> sobre el crecimiento de esferoides multicelulares MDA-MB-468.....	31
Figura 17. Efecto de la inhibición de <i>CBFB</i> en procesos relaciona- dos con la tumorigénesis mediante ensayos <i>in vivo</i> .....	32
Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama propuestos por Sørliier y colaboradores.....	8
Tabla 2. Cantidad de clonas fluorescentes de cada línea celular transfectada.....	23

## I. RESUMEN

---

El cáncer de mama (CaMa) es la primera causa de muerte por neoplasia maligna en mujeres a nivel mundial, con un estimado de más de 600,000 muertes sólo en el año 2018.

En los últimos años, se han realizado diferentes esfuerzos para analizar y caracterizar molecularmente al CaMa. En la actualidad, la clasificación basada en la expresión génica ha permitido implementar tratamientos específicos para cada subgrupo molecular, sin embargo, la mortalidad sigue siendo alta debido a que los subtipos difieren en la complejidad genómica y alteraciones genéticas clave. Por lo que el estudio de esta enfermedad se ha abordado a partir del análisis del genoma de CaMa, para encontrar factores con mayor impacto en el origen y la evolución del tumor.

En el 2014, nuestro grupo de trabajo en colaboración con instituciones como el Instituto Broad, la Escuela Médica de Harvard y el Instituto del Cáncer Dana-Farber, entre otros, realizó un análisis de secuenciación del genoma y el exoma completo con más de 100 muestras de CaMa, incluidas muestras de pacientes mexicanas. En este estudio se encontraron mutaciones significativas en la subunidad B del factor de unión al núcleo (*CBFB*).

*CBFB* forma parte del complejo proteico Factor de Unión al Núcleo (CBF), que es un factor de transcripción de genes relacionados al desarrollo, principalmente en la embriogénesis, la hematopoyesis y el desarrollo de huesos. *CBFB* es esencial para la mayoría de las funciones de CBF, ya que actúa como un regulador de su actividad, al aumentar la afinidad con la que el complejo se une al DNA, así como al evitar su degradación.

Al igual que muchos genes críticos para el desarrollo, los genes del complejo CBF también están involucrados en la carcinogénesis. Además de las mutaciones de *CBFB*, mencionadas anteriormente, se han reportado alteraciones en la expresión y mutaciones significativas de este gen en diferentes tipos de cáncer, como cáncer hepático, gástrico y cervicouterino. Por lo cual, se podría relacionar a *CBFB* con el desarrollo tumoral. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el papel de *CBFB* como un gen supresor de tumores, así como su papel efector en los estímulos que desencadenan la proliferación celular desregulada, particularmente en el CaMa.

En este proyecto, se abordó el estudio del papel de CFBF en el proceso tumorigénico, a partir de la inactivación del gen CFBF con el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 en las líneas celulares de CaMa MCF-7 y MDA-MB-468. La reducción en la expresión de CFBF por el sistema CRISPR-Cas9 en la línea MCF-7 resultó en un aumento de la proliferación y de la capacidad clonogénica, así como en el aumento en el tamaño de los esferoides multicelulares. Mientras que la inactivación de *CBFB* en la línea MD-MB-468, generó un efecto contrario al disminuir la capacidad proliferativa, clonogénica y de formación de esferoides tumorales.

Además, al realizar pruebas *in vivo* en embriones de pez cebra, si bien no se determinaron cambios en la capacidad de formar tumores, si se observaron desarreglos en la morfología de la cola de los embriones inyectados con la línea MCF-7 con *CBFB* inactivado. Se postula que este fenómeno puede deberse a la migración de las células inyectadas a este sitio y su proliferación. Se propone comprobar la reproducibilidad del fenómeno y realizar pruebas para confirmar esta hipótesis.

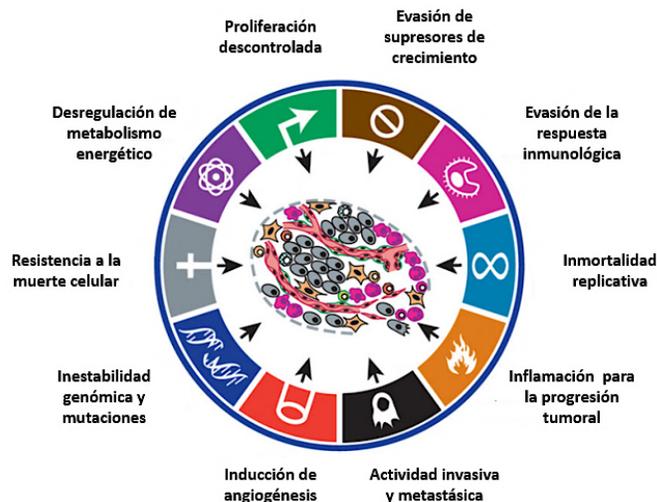
Los presentes resultados proporcionan evidencia de que el papel de CFBF en células de cáncer de mama es, probablemente, supresor tumoral o protumorigénico, dependiendo del contexto celular, específicamente del tipo de células mamarias en las que se desarrolle la patología. Por una parte, CFBF desempeña un papel supresor de tumores en el contexto de células luminales ER<sup>+</sup> (MCF-7), mientras que en el contexto de células que son consideradas metastásicas (MD-A-MB-468), CFBF desempeña una función protumorigénica.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer y sus características

De forma normal las células que constituyen nuestro organismo crecen, se dividen y mueren de una forma ordenada. Durante los primeros meses de vida de una persona las células se dividen rápidamente para facilitar el crecimiento, pero cuando se llega a edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para reemplazar a las células que han sufrido daño o se encuentran en proceso de apoptosis (muerte celular programada). Cuando las células de determinada parte del cuerpo comienzan a crecer de forma descontrolada, se origina el cáncer (Biswas *et. al*, 2004).

El cáncer es un conjunto de más de 100 enfermedades relacionadas al crecimiento y proliferación descontrolada de las células en alguna parte del cuerpo (American Cancer Society, 2018). Esta patología se origina cuando en una o más células normales del organismo ocurren modificaciones genéticas o epigenéticas, que no son capaces de ser reparadas. Dichas modificaciones le confieren a estas células características que las convierten en células cancerosas (figura 1), como la inestabilidad genómica y la presencia de mutaciones, una proliferación descontrolada, la inmortalidad replicativa, la evasión de las señales supresoras del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, alteraciones en el metabolismo energético, la generación de inflamación para la progresión del tumor, la inducción de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), la capacidad de invasión y metástasis (migración de células cancerosas a un tejido diferente al de origen para generar un nuevo tumor) y la evasión de la respuesta inmunológica (Hanahan & Weinberg, 2011; Weinberg, 2014).



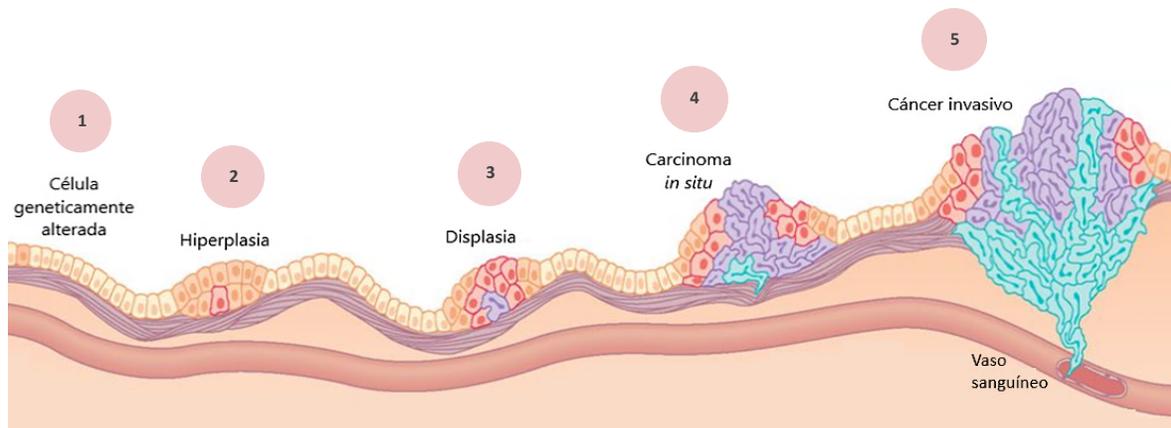
**Figura 1. Características del cáncer.**

En el esquema se muestran las 10 características propuestas por Hanahan y Weinberg en 2011, que adquieren las células durante el desarrollo del cáncer y que las definen como células cancerosas (modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

## 1.1 Desarrollo tumoral

La formación de un tumor es un proceso complejo que generalmente se desarrolla durante un período de décadas, en el que las células normales se convierten en células con fenotipos cada vez más neoplásicos, a través de un proceso denominado progresión tumoral descrito en la figura 2 (Weinberg, 2014).

La progresión del tumor está dirigida por una secuencia de mutaciones que ocurren al azar y alteraciones epigenéticas del DNA que afectan a los genes que controlan la proliferación celular, la supervivencia y otros rasgos asociados con el fenotipo de células cancerosas, mencionados anteriormente (Weinberg, 2014).



**Figura 2. Desarrollo tumoral.** **1)** El desarrollo de un tumor comienza cuando alguna célula (naranja) entre una población normal (beige) adquiere cambios genéticos o epigenéticos que incrementan su capacidad de proliferar. **2)** La célula alterada y sus descendientes (con características morfológicas normales) proliferan aceleradamente, condición denominada hiperplasia. Después de años, una de estas células (rosa) sufre otra(s) mutación(es) que genera la pérdida del control del crecimiento celular. **3)** Las células continúan proliferando y la descendencia acumula daños en el genoma y epigenoma, lo que resulta en células con forma anormal, proceso conocido como displasia. Algunas de estas células pueden sufrir más alteraciones (morado). **4)** Las células alteradas son más anormales en apariencia y crecimiento (morado). Además, existe una acumulación de estas células conformando una masa tumoral denominada tumor o carcinoma *in situ*. Eventualmente, alguna de estas células puede adquirir mutaciones adicionales (azul). **5)** Las alteraciones genéticas adicionales pueden conferirle a las células tumorales la capacidad de invadir tejidos diferentes al de origen, a través de la entrada al torrente sanguíneo o linfático y la migración a otros órganos donde se establecen para dar origen a un nuevo tumor (metástasis). (modificado de Weinberg, 1996).

Existen tres clases de genes que juegan un papel importante en el desarrollo tumoral:

1) Los protooncogenes: genes que desempeñan un papel fundamental durante las primeras etapas de desarrollo, ya que estimulan el crecimiento y la proliferación celular. Normalmente, aunque no siempre, se encuentran apagados durante la vida adulta y

debido a mutaciones o alteraciones que los activan o sobreexpresan, promueven la división celular continua implicada en el cáncer (Richards & Hawley, 2011; Weinberg, 1996).

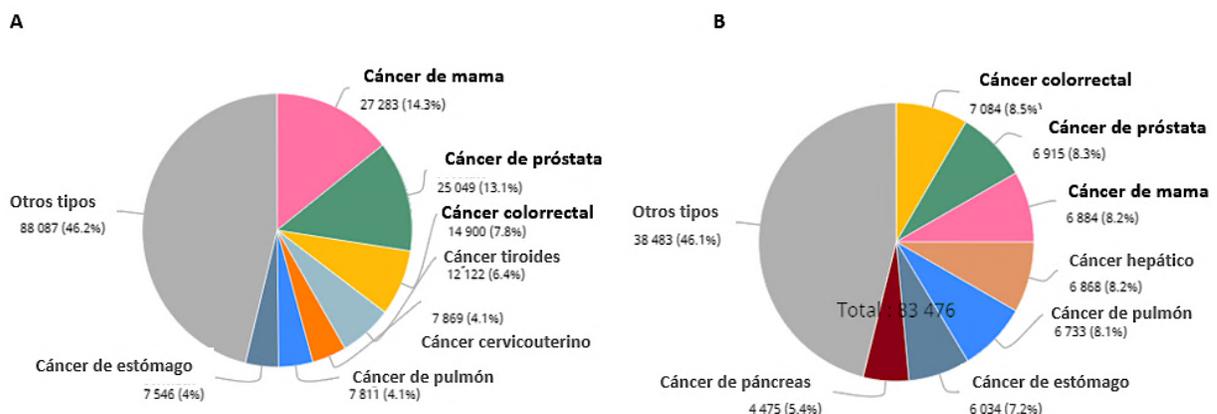
2) Los genes supresores de tumores: genes que inhiben la división celular y por mutaciones que los inactivan dan pie a la proliferación celular (Richards & Hawley, 2011; Weinberg, 1996).

3) Los genes de reparación del DNA: genes que otorgan la capacidad para replicar el DNA sin cometer errores y la capacidad para reparar el daño al DNA causado por el medio ambiente. Al verse alterados estos genes se permite que el DNA se escape de la reparación o que se repare incorrectamente, generando una mayor probabilidad de que una célula adquiera una mutación que desencadene el cáncer (Richards & Hawley, 2011; Weinberg, 1996).

### 1.2 Epidemiología del cáncer

La importancia del estudio de temas relacionados con el cáncer, radica en que este conjunto de enfermedades es una de las principales causas de muerte en todas las regiones del mundo, independientemente del nivel de desarrollo humano que posean. Sólo en el año 2018, se registraron cerca de 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.6 millones de muertes por esta causa a nivel mundial (IARC, 2018).

En México, el cáncer se presenta en 131.5 de cada 100 000 habitantes y es la tercera causa de muerte en la población, estimándose que fallecen por esta enfermedad 14 de cada 100 mexicanos (SSA, 2017). Los tipos de cáncer con mayor incidencia y mayor mortalidad en la población mexicana son el cáncer de mama, el de próstata y el colorrectal, como se muestra en la figura 3 (IARC, 2018).



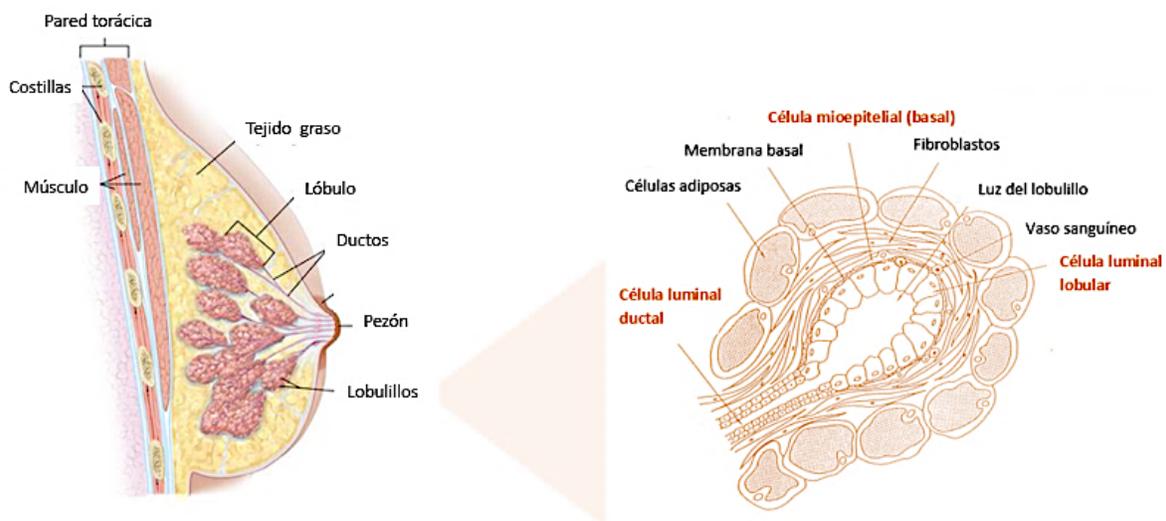
**Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en México.** Cifras y porcentajes de (A) casos nuevos y (B) muertes a causa de cáncer de acuerdo con el tipo, en la población mexicana en el año 2018 (modificada de IARC, 2018).

## 2. Cáncer de mama

A nivel mundial, el cáncer de mama (CaMa) es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la primera causa de muerte por neoplasia maligna en mujeres, con un estimado de más de 600,000 muertes sólo en el año 2018 (IARC, 2018).

En México, a partir del año 2006, el CaMa se ha considerado la primera causa de muerte por cáncer en la mujer y anualmente se estima una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres. Además, en el año 2013 se registraron 5,405 defunciones en mujeres y en el 2018 el registro fue de 6,684 defunciones, siendo las entidades con mayor mortalidad por CaMa; Coahuila (24.2%), Sonora (22.6%) y Nuevo León (22.4%) (IARC, 2018; SSA, 2015).

El CaMa es una enfermedad en la que existe proliferación acelerada y descontrolada de las células de alguno de los tejidos que conforman a la glándula mamaria (figura 4). El CaMa inicia con la hiperproliferación de las células del epitelio ductal (carcinoma ductal) o lobulillar (carcinoma lobulillar) mamario, que progresa a carcinoma *in situ*, posteriormente a carcinoma invasivo que realiza metástasis, generalmente, a ganglios linfáticos, pulmón, hueso, hígado y sistema nervioso (Polyak, 2007).



**Figura 4. Esquema anatómico-histológico de la glándula mamaria.** El tejido mamario se compone de lóbulos formados a su vez por infinidad de lobulillos que se encargan de producir la leche materna que se transporta por los ductos hacia el pezón. Entre los lóbulos y ductos existe tejido conectivo (encargado de darle sostén a los senos) y grasa. Existen 3 tipos principales células que conforman la glándula mamaria (naranja), células basales y luminales lobulares del lobulillo y las células luminales ductales de los ductos (modificado de Centro médico ABC, 2018).

La etiología del CaMa no se ha dilucidado por completo, sin embargo, hasta el momento se conoce que las mutaciones en ciertos genes, tanto supresores tumorales como protooncogenes, promueven el desarrollo tumoral. Los protooncogenes más reconocidos en CaMa son, el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), al cual, de forma normal, se unen los factores de crecimiento celular y promueve el crecimiento y la proliferación; *c-myc*, parte de un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en el crecimiento y la proliferación celular, la apoptosis y el metabolismo celular; y la ciclina D, un regulador del ciclo celular, el metabolismo y la migración celular (Parsa *et.al*, 2016; Boxer & Dang, 2001; Fu *et.al*, 2004).

Por otra parte, los supresores tumorales más frecuentemente mutados en CaMa son p53 que tiene un papel central en el control del daño al DNA, ya que cuando existe daño en el genoma, produce una señal de paro para detener la proliferación y corregir el daño y si la célula no puede reparar el daño, también genera la señal de apoptosis para evitar el paso de mutaciones a las células hijas; BRCA1 y BRCA2, genes que participan, también, en la reparación del DNA cuando existe daño y cuyas mutaciones representan un factor de riesgo con componente hereditario que incrementa en un 50-70% la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad (Faraoni & Graziani, 2018; Parsa *et.al*, 2016).

## **2.1 Clasificación**

Los tumores de mama se clasifican de acuerdo con su origen histológico en ductales o lobular y éstos, a su vez, pueden agruparse en *in situ* o invasivos, generando cuatro grupos: carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular *in situ* y carcinoma lobular invasivo (BCSC, 2000). La clasificación basada en la histología del tumor es utilizada cada vez en menor medida, debido a que es una clasificación muy general que lleva a la elección y aplicación de tratamientos terapéuticos poco efectivos; tomando en cuenta que existe una alta heterogeneidad molecular tumoral que genera diferentes comportamientos de la enfermedad y, por lo tanto, diversas respuestas al tratamiento en las pacientes que la padecen. Actualmente, la clasificación más aceptada es la basada en los perfiles de expresión global a partir de microarreglos de cDNA (DNA complementario) de muestras de pacientes con dicha enfermedad, que agrupa al CaMa en 5 subtipos, descritos en la tabla 1 (Perou *et.al*, 2000; Sørlie *et. al*, 2001).

**Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama propuestos por Sørlie y colaboradores, 2001.**

Subtipo molecular de CaMa		Descripción
Luminal A		Tumores con elevada expresión de receptor de estrógenos (ER), expresión o no de receptor de progesterona (PR), ausencia de HER2 y baja expresión de Ki67 (marcador de proliferación) por lo que proliferan lentamente (Eroles <i>et.al</i> , 2012, Holliday & Speirs, 2011).
Luminal B		Tumores con elevada expresión de ER, expresión o no de PR y HER2, además de expresión de Ki67 por lo que proliferan rápidamente (Eroles <i>et.al</i> , 2012; Tran & Bedard, 2011)
HER2 positivos		Elevada expresión de HER2, por amplificación del gen que lo codifica; y de Ki67 y nula expresión de ER/PR (Eroles <i>et.al</i> , 2012; González-Niño, 2007).
Triple Negativo	Basal	Expresan citoqueratinas 5, 6 y 17 como las células basales de los lobulillos; elevada expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), baja o nula expresión de ER/PR y HER2. Tumores altamente proliferativos y con un mal pronóstico por alta reincidencia después del tratamiento (Beadve <i>et.al</i> , 2011).
	Bajo en claudinas	Baja o nula expresión de ER/PR y HER2, expresión baja de E-cadherina y claudina 3 (moléculas de adhesión celular), por lo que son tumores altamente metastásicos e invasivos (Sabatier <i>et.al</i> , 2014).

### 3. Factores de unión al núcleo (CBFs)

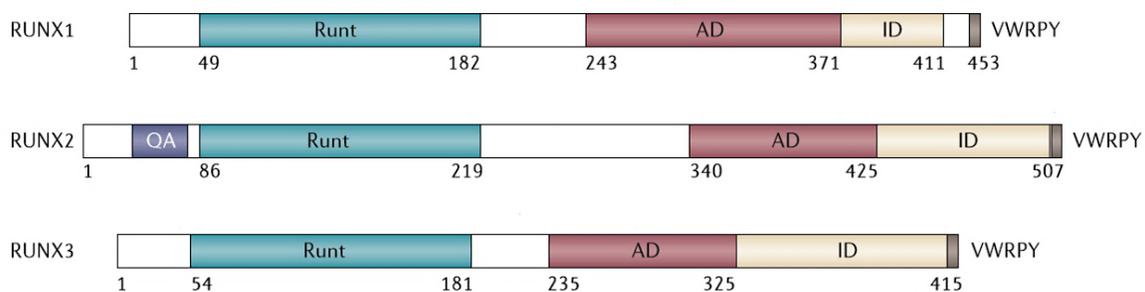
El complejo CBF (*Core Binding Factor* o *factor de unión al núcleo*) son factores de transcripción de unión al DNA, que juegan un papel importante en procesos como la embriogénesis, la hematopoyesis, y el desarrollo de los huesos, considerándose reguladores maestros de la determinación del destino celular en la sangre, los huesos y las neuronas. En los mamíferos estos factores de transcripción son heterodiméricos, es decir, están conformados por dos subunidades distintas, la subunidad  $\alpha$  (CBFA), determinada por una de las proteínas RUNX; y la subunidad  $\beta$ , determinada por CBFB, una proteína asociada común que no se une al DNA (Hart *et.al*, 2002; van Bragt *et.al*, 2014).

#### 3.1 Factor de unión al núcleo A (CBFA) o proteínas RUNX

La subunidad  $\alpha$  o CBFA es una proteína que, en mamíferos, puede estar codificada por tres genes distintos, *RUNX1* (*CBFA1/AML1/PEBP2\_B*), *RUNX2* (*CBFA2/AML3/PEBP2\_A*) y *RUNX3* (*CBFA3/AML2/PEBP2aC*), generando diferentes versiones de CBFA, proteína RUNX1, RUNX2 y RUNX3; y por lo tanto, diferentes versiones de CBF. A pesar de sus similitudes estructurales, estas tres proteínas tienen distintos patrones de expresión tisular y funciones fisiológicas diferentes dependiendo del contexto celular del que se hable. En general, las proteínas RUNX están relacionadas con las principales vías del desarrollo, como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Específicamente RUNX1 es necesaria para la hematopoyesis, RUNX2 es fundamental en la diferenciación de los

osteoblastos y los condrocitos y RUNX3 está involucrada en el desarrollo gastrointestinal y neuronal (Chimge & Frenkel, 2013; Chuang *et.al*, 2012; Huang *et.al*, 1999).

Las proteínas RUNX son la parte del complejo CBF capaz de unirse a secuencias específicas del DNA, gracias a que poseen un dominio de homología de runt (RDH) (Chimge & Frenkel, 2013; Huang *et.al*, 1999). El dominio RDH (figura 5) está conformado por 128 a.a y está altamente conservado evolutivamente. Éste es homólogo a la proteína runt de *Drosophila*, un miembro de una familia de proteínas de unión al DNA, por lo que el dominio RDH tiene la propiedad de unirse al DNA específicamente en secuencias consenso 5'-PuACCPuCA-3' (donde Pu indica purinas). De esta forma, CBFA puede activar y reprimir la transcripción de los genes. Además, el dominio RDH también contiene una región que heterodimeriza con un dominio localizado a 135 a.a del extremo N-terminal de la subunidad CBFβ, forma por la cual se unen ambas subunidades (Ito *et.al*, 2015; Zhang *et.al*, 2003; Zhao *et. al*, 2016).



**Figura 5. Esquema de la estructura de las proteínas RUNX.** Las tres proteínas RUNX contienen un dominio Runt de unión al DNA (definido en el texto como RDH), un dominio de activación (AD) y un dominio inhibitorio (ID). Se indica una región QA, que se refiere a las repeticiones en tándem de los aminoácidos de glutamina y alanina, exclusivos de RUNX2 (modificado de Ito *et.al*, 2015).

### 3.1.1 RUNX y cáncer

Al igual que como muchos genes críticos para el desarrollo, los genes *RUNX* también están involucrados en la carcinogénesis, manifestando propiedades supresoras de tumores, pero también, propiedades oncogénicas dependiendo del contexto.

Como ya se mencionó, RUNX1 es esencial para la hematopoyesis definitiva y en las leucemias mieloides y linfoides es un blanco frecuente de translocaciones cromosómicas y mutaciones puntuales. Dichas mutaciones inhiben la función normal de RUNX1, generando perturbaciones en la diferenciación del linaje, que predisponen a la leucemia. Prueba de ello es que, en modelos murinos deficientes en RUNX1 se ha observado un

aumento en la susceptibilidad al desarrollo de la Leucemia Mieloide Aguda (AML) (Jacob *et.al*, 2010). De tal forma que RUNX1 se considera un supresor de tumores en el contexto de neoplasias hematológicas.

Además, en tumores de tipo epitelial, se ha evidenciado el papel de RUNX1 como un supresor tumoral con el hallazgo de mutaciones somáticas en tumores de mama del estudio BRC77 de la Universidad de Washington (Ellis *et. al*, 2012) y en la cohorte de pacientes con CaMa del proyecto piloto del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés). De igual forma, en un estudio de secuenciación de genoma completo de mujeres con CaMa, incluyendo muestras de mujeres mexicanas, se observaron deleciones de este gen (Banerji *et. al*, 2014). En otros estudios, *RUNX1* fue uno de los 17 genes cuyo patrón de expresión predijo la metástasis del CaMa. La expresión de *RUNX1* es menos abundante en el CaMa en comparación con las células epiteliales mamarias normales, y disminuye progresivamente a medida que aumenta la agresión del tumor (Ramaswamy *et. al*, 2003).

Por su parte, RUNX2 es un factor específico del linaje óseo que se ha relacionado con el osteosarcoma, se ha observado un aumento de la expresión de *RUNX2* en células de cáncer de mama y próstata que metastatizan al hueso y cuando se inhibe este gen en estas líneas celulares, la tumorigénesis y la osteólisis se previenen, lo cual indica el papel protumorigénico y prometastático de este gen (Javed *et. al*, 2005). *RUNX2* es cada vez más reconocido en el campo del cáncer por sus propiedades oncogénicas, que se han demostrado en diversos modelos, como en un modelo de ratón, donde *RUNX2* funcionó como un oncogén dominante en el linfoma de células T. Además, la amplificación de *RUNX2* en el cromosoma humano 6p21 se relacionó con el osteosarcoma, una neoplasia maligna que surge de los osteoblastos (Chimge & Frenkel, 2013). Este gen está sobreexpresado en carcinomas de colon (Sase *et. al*, 2012), páncreas (Kayed *et. al*, 2007) y tiroides (Endo *et. al*, 2008).

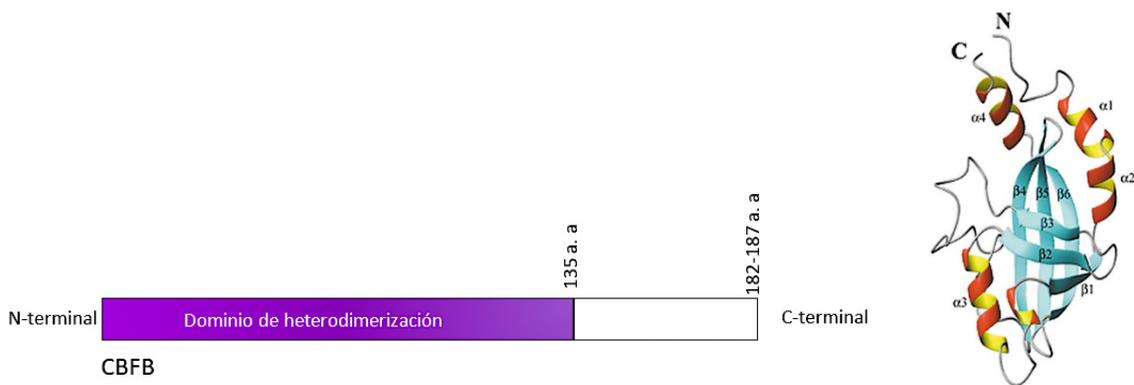
RUNX3 es necesario para el desarrollo de las células T y tiene un papel principal que determina la función neuronal. Además de su capacidad para regular la expresión génica específica del linaje en los procesos del desarrollo, se ha demostrado que RUNX3 está involucrado en la formación de varios tipos de cáncer. Se han observado mutaciones inactivantes de RUNX3 en pacientes con cáncer (Chen, 2012). Aunado a esto, *RUNX3* se encuentra en la región cromosómica 1p36, que se elimina frecuentemente en varios tipos de cáncer. Es importante destacar que varios estudios han demostrado que la hipermetilación y el silenciamiento de la expresión del gen *RUNX3* (hasta el 80%) prevalece en tumores sólidos de origen mamario, colon, pulmonar, vesical y gástrico, que

indican que una metilación aberrante de *RUNX3* puede ser útil para la detección o el pronóstico del cáncer (Birnbaum *et. al*, 2011; Bieche *et. al*, 1993).

### 3.2 Factor de unión al núcleo B (CBFB)

La subunidad  $\beta$  (CBFB), también denominada PEBP2B, es la parte de CBF que no se une al DNA. CBFB es codificada únicamente por el gen *CBFB*, localizado en 16q22.1. Este gen está conformado por 6 exones y genera por splicing alternativo dos variantes de mRNA que dan lugar a diferencias en el extremo carboxilo de la proteína, produciéndose dos isoformas de la proteína de aproximadamente 22 KDa, que tienen estructuras terciarias parecidas (figura 5) y la misma afinidad para unirse a CBFA (Ito *et.al*, 2015; NCBI, 2017; UniprotKB, s.f.).

CBFB tiene un dominio de heterodimerización cercano al extremo N-terminal (figura 6), a través del cual se une al dominio RDH de las RUNX. Esta región es parecida estructuralmente y funcionalmente a dos proteínas encontradas en *Drosophila*, brother (Bro) y big-brother (Bgb), y a su vez a un homólogo del pez cebra (cbfb), de las que se sabe que aumentan la afinidad de unión del dominio runt al DNA y también son capaces de aumentar la capacidad de unión al DNA de las proteínas RUNX de mamífero (Hart & Foroni, 2002). De acuerdo con lo anterior, la función de CBFB al unirse a CBFA, es aumentar la afinidad con la que se unen las RUNX a las regiones específicas en el DNA, mencionándose que aumenta dicha afinidad de 6 a 10 veces más o hasta 40 veces más y que lo logra gracias a que la unión de CBFB-CBFA induce un cambio conformacional en CBFA desplazando su dominio inhibitorio (Huang *et. al*, 1999; Zhang *et. al*, 2003; Zhao *et. al*, 2016). Además, se ha demostrado que CBFB mejora la estabilidad de las proteínas RUNX, específicamente de RUNX1, al evitar su degradación mediada por ubiquitina en el proteosoma, por lo que puede decirse que CBFB es esencial para la mayoría de las funciones de las proteínas RUNX. Prueba de ello, es que en modelos Knockout (de inactivación) condicionales de ratón para CBFB se generan fenotipos similares a los de ratones deficientes en RUNX1 y ratones deficientes de RUNX2, debido a que la mutación de *CBFB* o la interrupción de la interacción RUNX-CBFB compromete la estabilidad y la actividad transcripcional de RUNX (Chen *et. al*, 2014; Wang *et. al*, 1996). Sin embargo, en algunos estudios se considera a CBFB, únicamente, como un coactivador o un regulador, ya que existe evidencia de que en algunas situaciones las proteínas RUNX pueden regular la expresión génica independientemente de CBFB e *in vitro*, se ha observado que RUNX puede unirse al DNA en ausencia de CBFB, pero con menor afinidad que el complejo CBFA-CBFB (Zhang *et. al*, 2003; Zhao *et. al*, 2016).



**Figura 6. Esquema de la estructura de CBFβ.** Lado izquierdo: se muestra un esquema de longitud completa de CBFβ con el dominio de heterodimerización (en morado) en el extremo N-terminal. Lado derecho: esquema de la estructura terciaria de CBFβ (Modificado de Zhang *et.al*, 2003).

### 3.2.1 CBFβ y cáncer

CBFβ es esencial para la hematopoyesis y para el desarrollo del esqueleto, por su interacción con las proteínas RUNX, y al igual que éstas también puede estar involucrado en el proceso tumorigénico. Recientemente, se han reportado alteraciones en la expresión y mutaciones significativas de CBFβ en diferentes tipos de cáncer, como cáncer hepático (Miyagawa *et.al*, 2006), cervicouterino (Ojesina *et. al*, 2014) y de mama (Banerji *et. al*, 2014). CBFβ está involucrado en la AML, ya que el cromosoma 16 (en el que se encuentra codificado CBFβ) es blanco de las aberraciones más comunes asociadas con esta enfermedad como la inversión en el cromosoma 16 [inv (16) o t (16;16)], resultando en un gen de fusión entre CBFβ y SMMHC (el gen que codifica la cadena pesada de la miosina de músculo) (Liu *et.al*, 1993; Niki *et. al*, 1997).

Por otra parte, Sakakura y col. en el 2005 examinaron la expresión de los genes *RUNX1*, de *RUNX2*, *RUNX3* y de *CBFβ* en líneas celulares de cáncer gástrico y en muestras primarias de este tipo de cáncer, y observaron una disminución significativa en los niveles de *RUNX3* y de *CBFβ*. Además, el porcentaje de disminución de *RUNX1*, *RUNX3* y de *CBFβ* se incrementaba conforme el estadio de cáncer progresaba, postulando que *RUNX1* y *CBFβ*, junto con *RUNX3*, podrían participar en el desarrollo del cáncer gástrico. De forma similar, en un estudio de carcinomas hepatocelulares se observó la disminución en la expresión de *RUNX1* y de *RUNX3*, así como en *CBFβ* en mayor medida. La prevalencia de los niveles bajos de *RUNX1*, *RUNX3* y *CBFβ*, incrementó la progresión de lesiones precancerosas a carcinoma hepatocelular, lo cual sugiere la función de estos genes en la carcinogénesis hepática (Miyagawa *et.al*, 2006).

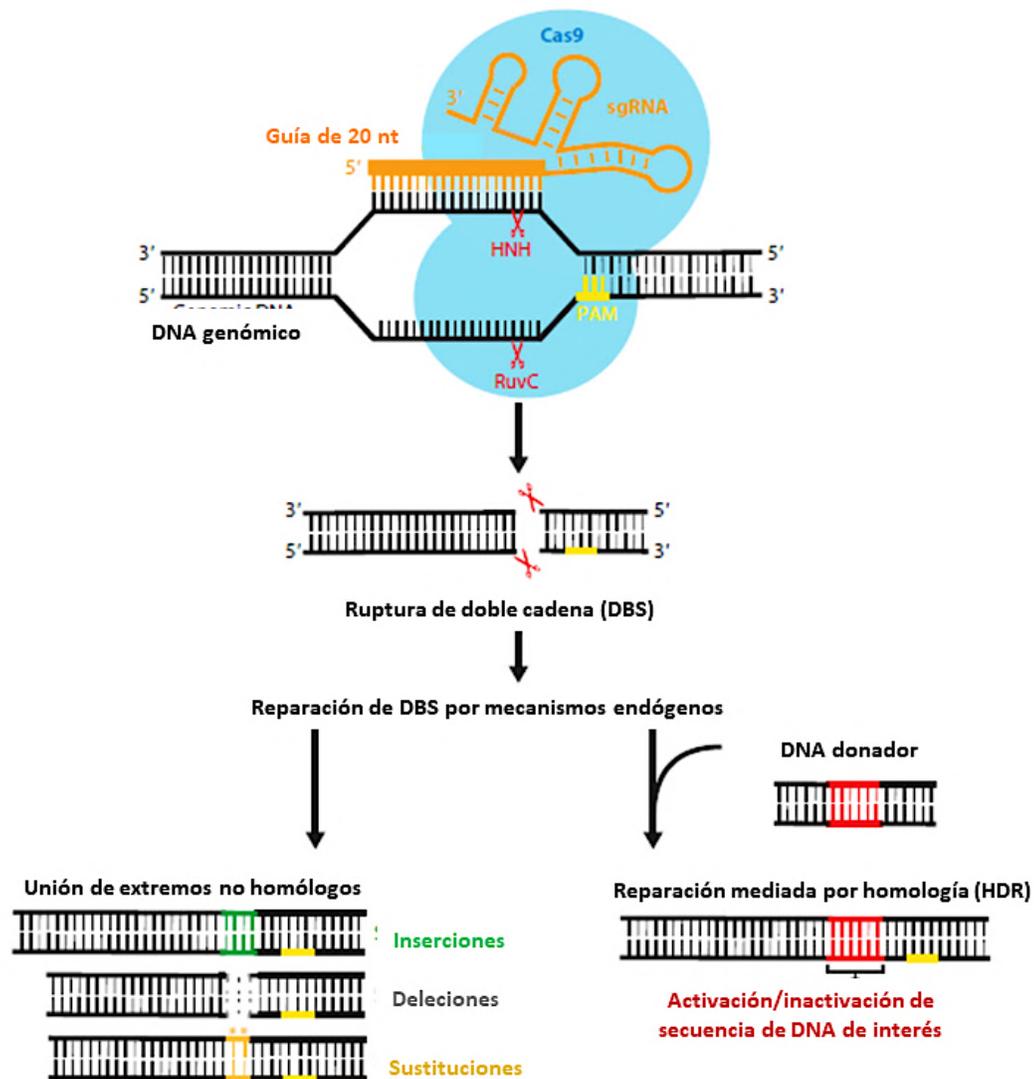
De forma contraria a lo observado en los estudios mencionados, Mendoza y col. en el 2010, demostraron que *CBFB* se encuentra expresado en células de cáncer de mama metastásico y que es esencial para la invasión celular, lo cual sugiere un papel prometastásico de este gen. En adición, Davis y colaboradores en el 2010 demostraron en células de cáncer prostático y ovárico que *CBFB* tiene un papel regulador del fenotipo maligno, postulando que su expresión es requerida para dicho fenotipo.

En un estudio realizado referente a secuenciación de genoma, exoma y transcriptoma de cáncer cervicouterino nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Instituto de Cáncer Dana-Farber, el Instituto Broad, el Hospital Universidad Haukeland y otras instituciones, encontró diferentes mutaciones, entre ellas mutaciones somáticas en *CBFB* en adenocarcinomas (Ojesina *et.al*, 2013). También, en un análisis de la secuenciación del genoma y exoma completo con más de 100 muestras de CaMa, incluidas muestras mexicanas, encontramos mutaciones significativas de *CBFB*, específicamente mutaciones inactivantes de la proteína relacionadas a CaMa RE<sup>+</sup> (Banerji *et. al*, 2014). De tal forma que, se podría relacionar a *CBFB* con el proceso tumorigénico, aunque actualmente se desconoce el papel que tiene este gen en el proceso de carcinogénesis.

#### **4. CRISPR-Cas9 y la edición del genoma**

La regulación y la edición precisa de la información genómica son acciones esenciales para comprender la función de un gen determinado, que los avances tecnológicos han facilitado considerablemente, durante las últimas décadas. El sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated protein 9*), considerado un mecanismo de defensa bacteriana contra la infección por bacteriófagos y la transferencia de plásmidos de forma natural, ha sido adaptado como una plataforma simple, guiada por RNA para la edición y regulación del genoma altamente específica en diversos organismos; creando así una revolucionaria herramienta para la investigación biomédica y nuevas posibilidades para el tratamiento de trastornos genéticos (Jiang & Doudna, 2017; Wang *et.al*, 2016).

En general, la edición precisa de la información genómica a nivel de DNA requiere la acción de una maquinaria molecular compuesta de dos partes principales: un dominio de unión a DNA que media en el reconocimiento y la unión al DNA específica de secuencia, y un dominio efector que permite la escisión del DNA o regulación de la transcripción cerca del sitio de unión. De tal forma que, CRISPR-Cas9 consiste en un componente proteico, Cas9, con actividad de nucleasa, que corta el DNA; y un RNA guía, que dirige a Cas9 hacia la secuencia de DNA que se quiere editar. El proceso de edición génica con CRISPR-Cas9 incluye dos pasos principales, descritos en la figura 7 (Jiang & Doudna, 2017).



**Figura 7. Mecanismo de edición génica mediada por CRISPR-Cas9.** La edición génica con CRISPR-Cas9 se genera en dos pasos principales: 1) el RNA guía (sgRNA) complementario a la región del DNA que se quiere modificar, se asocia con la enzima Cas9 y gracias a las reglas de complementariedad de nucleótidos, el RNA hibrida con la secuencia de interés presente en el genoma, dirigiendo a la endonucleasa Cas9 a cortar el DNA en la región concreta, generando una ruptura de doble cadena (DBS). 2) Se activan los mecanismos naturales de reparación del DNA fragmentado. En ausencia de una plantilla de reparación, se activa la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y causa inserciones y eliminaciones aleatorias o incluso sustituciones en el sitio de DSB, que con frecuencia resultan en la interrupción de la función del gen. En presencia de una plantilla donante que contiene una secuencia de interés respaldada por los brazos de homología, se puede iniciar la ruta de la reparación mediada por homología (HDR) para crear las mutaciones deseadas mediante la recombinación homóloga, que proporciona la base para realizar una modificación genética precisa, como la activación del gen, delección, corrección o mutagénesis (modificada de Jiang & Doudna, 2017).

### III. JUSTIFICACIÓN

---

A pesar de los esfuerzos por caracterizar molecularmente al CaMa y generar clasificaciones de esta enfermedad que permitan implementar tratamientos más específicos dependiendo del subgrupo molecular, la mortalidad a causa de la misma sigue siendo alta, debido a que los subtipos difieren en la complejidad genómica y alteraciones genéticas clave. Por lo que, el estudio de esta enfermedad se ha abordado a partir del análisis del genoma de CaMa, para encontrar factores con mayor impacto en el origen y la evolución del tumor.

El origen del CaMa no se ha dilucidado por completo, sin embargo, hasta el momento se conoce a fondo que las mutaciones en ciertos genes, tanto supresores tumorales (*p53*, *BRCA1* y *2*) como protooncogenes (*HER-2*, *c-myc* y *ciclina D*), promueven el desarrollo tumoral.

Recientemente, en un análisis de secuenciación del genoma y el exoma completo con más de 100 muestras de CaMa, incluidas muestras mexicanas, nuestro grupo de trabajo encontró mutaciones inactivantes significativas en *CBFB*. Hasta ahora, no se ha estudiado el papel de *CBFB* como un gen supresor de tumores, ni su participación conjunta con miembros de la familia *RUNX* en el cáncer. Tampoco se conoce el papel efector de este gen en los estímulos que llevan a desencadenar la proliferación celular desregulada, particularmente en el CaMa, a pesar de ser un gen que se ha encontrado mutado en este y en otros tipos de cáncer.

En este proyecto, se inhibió al gen *CBFB* en líneas celulares de cáncer de mama mediante la técnica de CRISPR-Cas9, un sistema de edición génica, que recientemente ha sido descrito; y se analizó el efecto de esta inhibición en los procesos de proliferación, clonogenicidad, formación y crecimiento de esferoides tumorales en dos líneas celulares de cáncer de mama, así como la capacidad tumorigénica de estas líneas en embriones de pez cebrá.

#### **IV. HIPÓTESIS**

---

La inactivación de *CBFB* favorecerá los procesos de proliferación, clonogenicidad, formación y crecimiento de esferoides tumorales en líneas celulares de cáncer de mama, así como la capacidad tumorigénica de éstas en embriones de pez cebra.

## V. OBJETIVOS

---

### 1. Objetivo general

Analizar el efecto de la inhibición/inactivación del gen *CBFB*, generada por el sistema CRISPR-Cas9 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468, sobre procesos biológicos relacionados con la tumorigénesis mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

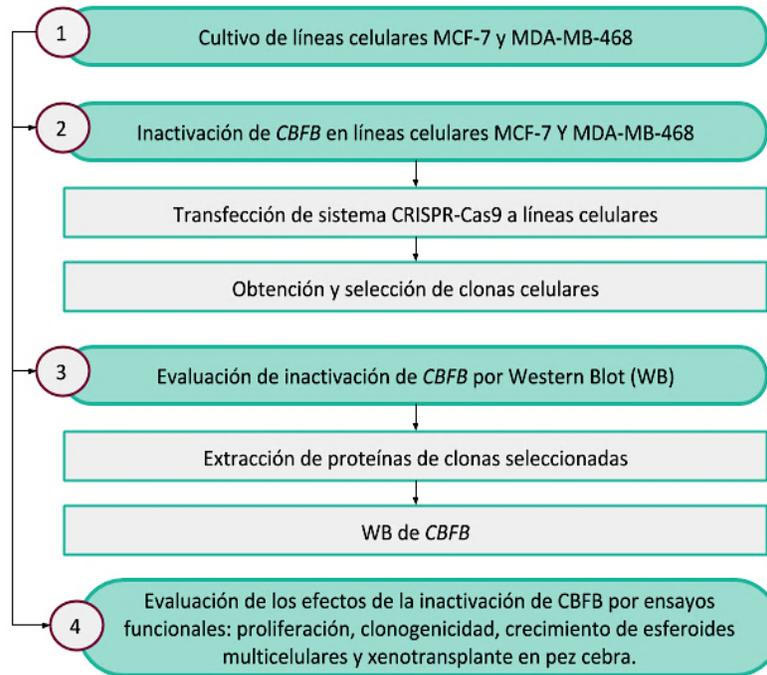
### 2. Objetivos particulares

- Inactivar al gen *CBFB* mediante la técnica de CRISPR-Cas9 en las líneas celulares MFC-7 y MDA-MB-468.
- Comprobar la inactivación de *CBFB* en las líneas MFC-7 y MDA-MB-468 mediante Western blot.
- Determinar el efecto de la inactivación de *CBFB* mediante ensayos *in vitro* de proliferación, clonogenicidad y crecimiento de esferoides tumorales.
- Determinar el efecto de la inactivación de *CBFB* mediante ensayos *in vivo* de tumorigénesis por xenotransplante a embriones de pez cebra.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

---

De forma general, el proyecto se abordó siguiendo el siguiente esquema mostrado en la figura 8.



**Figura 8. Esquema general de la metodología.** El esquema muestra la metodología seguida para generar y comprobar la inactivación del gen *CBFB* en líneas celulares, así como la evaluación de los efectos de dicha inactivación.

### Líneas celulares

MCF-7 (ATTC<sup>®</sup>, HTB-22<sup>™</sup>). Células de tipo epitelial provenientes de adenocarcinoma mamario, consideradas un modelo de cáncer de mama tipo luminal A.

MDA-MB-468 (ATTC<sup>®</sup>, HTB-132<sup>™</sup>). Células de tipo epitelial de adenocarcinoma mamario, consideradas un modelo de cáncer tipo triple negativo.

### Cultivo celular en monocapa y criopreservación

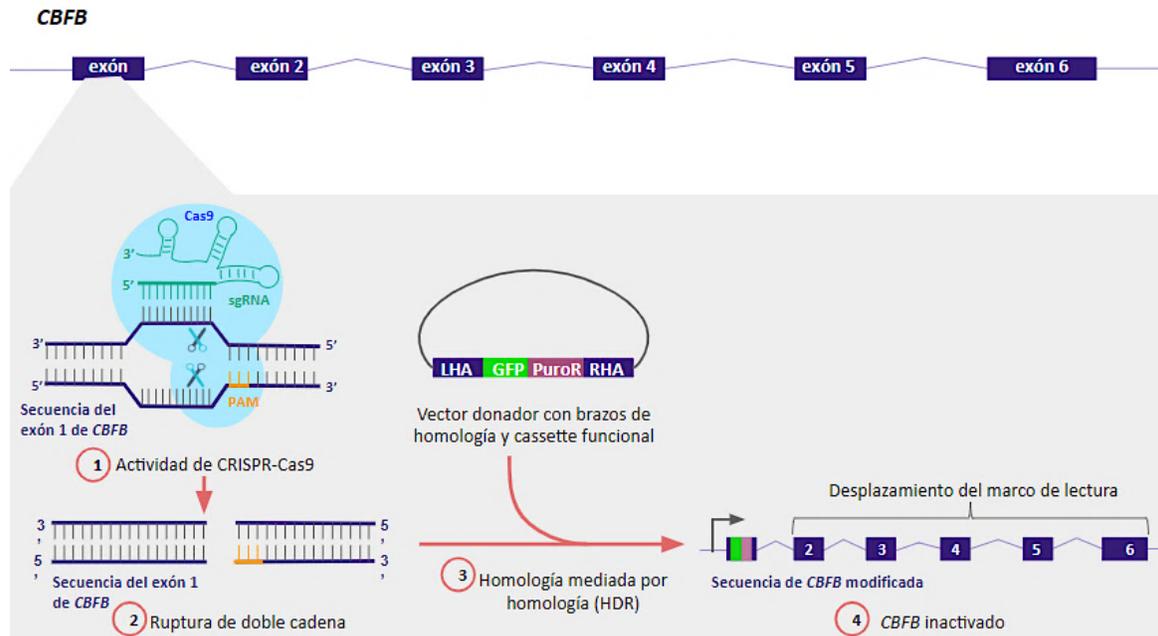
Las líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB-468) se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, a 37°C con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> v/v.

Para la criopreservación, al tener una confluencia del 80%, las células se trataron con tripsina, se preparó una suspensión celular en SFB con 10% dimetilsulfóxido (DMSO) en un criovial. Se congelaron los crioviales gradualmente, a  $-20^{\circ}\text{C}/1\text{h}$  y posterior cambio a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Inactivación de *CBFB* por el sistema CRISPR-Cas9 / Transfección de las células en monocapa

La inhibición del gen *CBFB*, se llevó a cabo utilizando el sistema CRISPR-Cas9, con el kit “*CBFB* Human Gene Knockout Kit CRISPR” (Origene). En resumen, el sistema consiste en tres vectores pCas-Guide con dos secuencias blanco diferentes dirigidas al exón 1 de *CBFB* (G1, G2) y una secuencia control (Scr), respectivamente. También consiste en un plásmido donador que contiene brazos de homología izquierdo y derecho que flanquean un cassette funcional. El mecanismo para generar la inactivación se muestra en la figura 9.

La transfección de los vectores se realizó utilizando el kit Fugene HD transfection reagent (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, se sembraron 15, 000 células/pozo en placa de 96 pozos. 24 h después, se preparó la mezcla de transfección, con  $1\mu\text{g}$  de plásmido con el sistema CRISPR y  $1\mu\text{g}$  del plásmido donador y se añadió al cultivo celular. Se realizó una segunda transfección, 48 h después de la primera transfección realizada.



**Figura 9. Mecanismo de inactivación de *CBFB* por el sistema CRISPR-Cas9.** 1) RNA guía (sgRNA), G1 o G2, dirigen a Cas9 al sitio blanco en el exón 1 de *CBFB* para cortar el DNA de doble cadena. 2) Cas9 corta el DNA en el sitio blanco y produce una ruptura de doble cadena (DBS). 3) Inician los mecanismos de reparación de DNA en el sitio de DSB y el vector donador proporciona la plantilla para la reparación mediada por homología (HDR). 4) El cassette funcional se incorpora al genoma produciendo un cambio de marco de lectura del gen *CBFB* y, por lo tanto, su inactivación.

## **Selección de células con transfección y ejecución de sistema CRISPR-Cas9 exitosos a partir de gen reportero**

Posterior a las transfecciones, se sembraron clonas de cada línea, es decir, se sembró 1 célula/pozo en placas de 96 pozos. Para lo cual, se tripsinizaron las células de cada pozo y se realizaron diluciones. Tres semanas después, cuando las clonas proliferaron, fueron revisadas por microscopía de fluorescencia, para corroborar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) y de esta forma la eficacia del sistema CRISPR-Cas9 e inserción del cassette en la secuencia del gen CFBF. La fluorescencia fue revisada en la Unidad de microscopía confocal del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en un microscopio confocal LSM 510. Axiovert 200M (Carl Zeiss), utilizando un Láser Argón/2 (para  $\lambda =$  de 458, 477, 488, 514 nm).

### **Extracción de proteínas totales**

La extracción de proteínas totales se realizó utilizando el buffer M-PER (Thermo Fisher Scientific). Se lavaron los cultivos con PBS 1X, se raspó el cultivo con un scraper, generando una suspensión celular que fue centrifugada. Al retirar el sobrenadante, se adicionó al botón celular una mezcla de buffer de lisis M-PER/inhibidores de proteasas 1X y se incubó la mezcla a temperatura ambiente/550 rpm/10 min. El lisado se centrifugó a 14000 rpm/15 min y el sobrenadante fue transferido a otro tubo y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Western Blot (WB)**

Se realizó la electroforesis unidimensional vertical de proteínas en geles de poliacrilamida al 15%, con cantidades estandarizadas de proteínas. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF por transferencia semihúmeda. Las membranas se bloquearon con una solución de leche en TBS-Tween al 1% por una hora y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por una noche con el anticuerpo primario. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-tween y se incubaron con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente por una hora. Se lavó el anticuerpo secundario de la membrana con TBS-tween. La señal se desarrolló con el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anticuerpos: anti-CBFb (EPR6322) de Abcam (dilución 1:1000), Anti-GAPDH (sc-365062) de Santa Cruz, Anti-IgG de conejo conjugado a HRP (W4021) y anti-IgG de ratón conjugada a HRP de Promega (dilución 0.2:1000).

### **Análisis densitométrico**

Se utilizó el software ImageJ para realizar la densitometría. De esta forma, se obtuvieron unidades arbitrarias del área e intensidad de cada una de las bandas del WB. Las bandas se normalizaron de acuerdo con su control de carga respectivo, GADPH, calculándose de esta forma la expresión relativa.

### **Técnica de cristal violeta**

Las células libres de medio y fijadas con etanol 70% por 10 min., se tiñeron con cristal violeta por 10 min. Posteriormente, se retiró el colorante mediante lavados continuos con agua. Se añadió ácido acético al 33% para disolver el colorante y se realizó la lectura de absorbancia de la placa a  $\lambda=590$  nm, en el lector de microplaca DTX880 multimode detector.

### **Proliferación celular**

Las líneas celulares se sembraron por cuadruplicado en placas de 96 pozos, 1, 000 células/pozo. Las células se fijaron con etanol 70% los días 1, 3, 5, 7, 9, 11. Posterior a ser fijadas, las células se analizaron mediante la técnica de cristal violeta. Se realizaron tres réplicas independientes.

### **Clonogenicidad**

Ambas líneas celulares se sembraron por triplicado en placas de 6 pozos. Se sembraron 500 células por cada pozo. Trece y once días después para MCF-7 y MDA-MB-468 respectivamente, la clonogenicidad se determinó fijando las células, tiñéndolas con la técnica de cristal violeta y el conteo las colonias formadas con el software ImageJ. Se realizaron tres réplicas independientes para MCF-7 y dos réplicas para MDA-MB-468.

### **Formación de esferoides tumorales**

Se realizó la técnica de "rotación giratoria". Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en frascos de cultivo en suspensión con medio Leibovitz L-15 complementado con SFB al 5%. Se mantuvieron por 14 días en una incubadora con agitación constante a 100 rpm/37°C, realizando cambio de medio cada 48 h. Se tomaron fotografías y medidas del diámetro de 10 esferoides cada 48 h comenzando 24 h posterior al sembrado. Las fotografías fueron capturadas en el microscopio Axio Scope A.1, bajo el objetivo 10X, se utilizó una cámara Canon acoplada al microscopio y el software AxioVisionRel. 4.8., con el cual se colocó una barra de escala de 100  $\mu\text{m}$  en cada fotografía. Para determinar la medida del diámetro se

utilizó el programa Imagej, en el que se determinó la cantidad de píxeles contenidos en el diámetro de cada esferoide y se comparó con la cantidad de píxeles contenidos en la barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

### **Xenotransplante a embriones de pez cebra**

Se obtuvieron embriones a partir de cruzas naturales de peces cebra (*Danio rerio*) de la cepa TabWik, los cuales se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento. Se microinyectaron un total de 300 células de cada línea celular (MCF-7 Scr clona 14, G1 clona 10 y G2 clona 9 y MDA-MB-468 Scr clona 2 y G2 clona 3) en la región del vitelo de los embriones de 48 horas post-fertilización (hpf) previamente anestesiados con triclaína 0.2% (Liu *et. al*, 2015). La inyección de las células se realizó mediante un pulso de gas nitrógeno utilizando una aguja de borosilicato (Sutter Instrument) conectada a un microinyector neumático (PLI-100, Warner Instruments). Luego de la inyección, los embriones fueron colocados en agua de acuario y mantenidos en incubación a 34 °C, con un cambio de agua diariamente.

La capacidad tumorigénica se evaluó en los embriones trasplantados a los 4 días posteriores a la inyección de las células (4 dpi). Para analizar la tumorigénesis los embriones fueron visualizados y fotografiados *in vivo* mediante microscopía de campo claro.

Por otra parte, para los estudios de migración, las células inyectadas fueron previamente teñidas con el kit PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma-aldrich), para su visualización mediante microscopía de epifluorescencia. La capacidad migratoria se determinó contabilizando el número de células fluorescentes fuera del sitio de inyección. Los embriones anestesiados con triclaína 0.2 % fueron observados en el microscopio Axio Scope A.1 (Zeiss), bajo el objetivo 10X, tanto en campo claro como con el filtro para fluorescencia roja. Las fotografías se obtuvieron con una cámara Canon acoplada al microscopio y el software AxioVisionRel. 4.8. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Fiji-ImageJ.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como el promedio de las réplicas biológicas  $\pm$  la desviación estándar (SD). La comparación estadística entre grupos experimentales y grupos control se realizó utilizando la prueba de ANOVA de dos vías (Bonferroni), para los ensayos de proliferación y crecimiento de esferoides. Mientras que para el ensayo de clonogenicidad, los resultados fueron analizados por prueba t de student. En ambos casos los resultados se consideraron significativos cuando el valor  $p < 0.05$  (\*).

## VII. RESULTADOS

---

### Inactivación de *CBFB* en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468

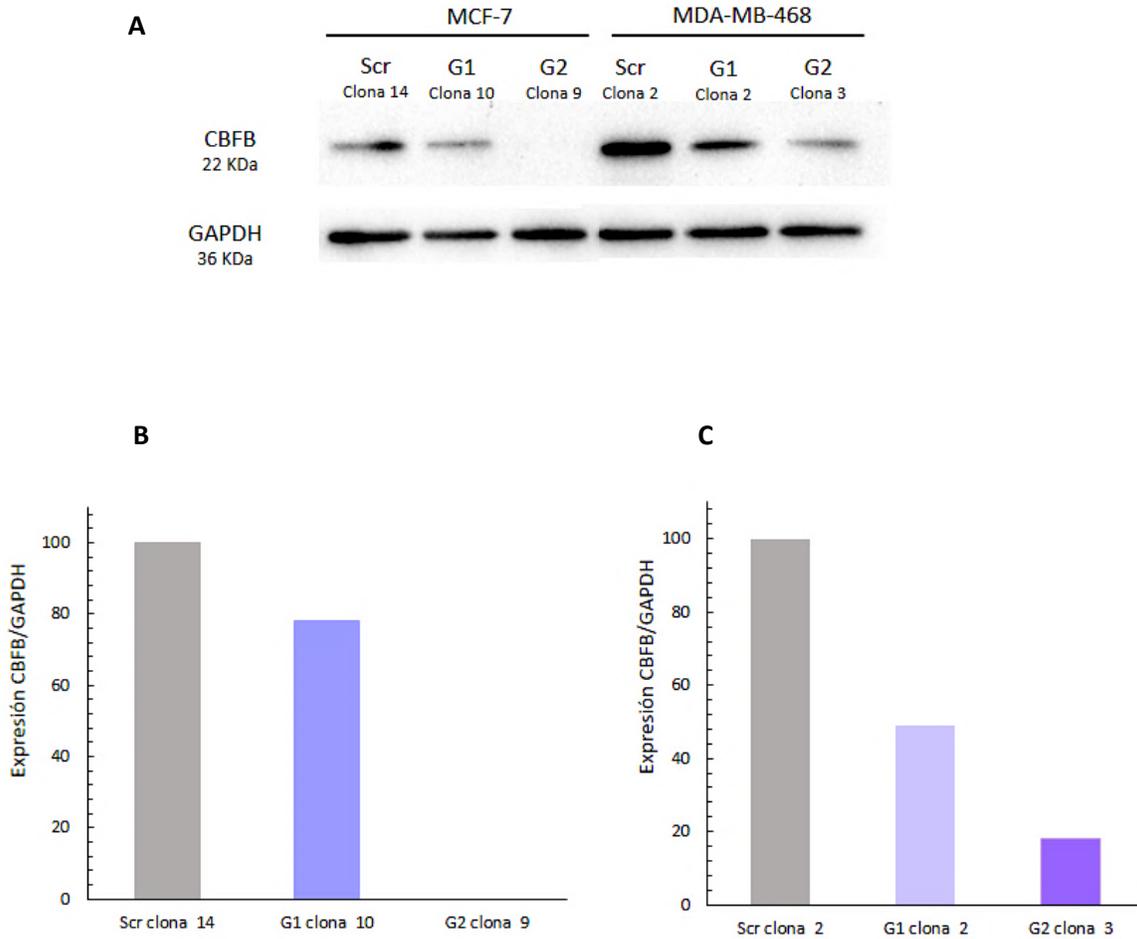
Para generar la inactivación de *CBFB* con el sistema CRISPR-Cas9 descrito, se realizó la interrupción del marco de lectura del gen, con la inserción de un cassette funcional al inicio de la secuencia del exón 1 de *CBFB*, tal y como se muestra en la figura 9. El cassette funcional insertado en su secuencia, incluye el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), además del gen de resistencia a puromicina (PuroR). De tal forma que las células transfectadas en donde se logró insertar el cassette en el genoma de manera exitosa, adquirieron la fluorescencia otorgada por GFP. Razón por la cual, se seleccionaron en primera instancia, las clonas celulares que exhibieron fluorescencia verde. En la tabla 2, se observa la relación de clonas que mostraron fluorescencia, tanto para la línea MCF-7 como para la línea MDA-MB-468. En ambos casos, las clonas fluorescentes únicamente provinieron de las células en las que el sistema CRISPR-Cas9 fue dirigido por la guía 1 (G1) o la guía 2 (G2). En el caso de las clonas formadas a partir de células transfectadas con el sistema CRISPR-Cas9 y la secuencia Scr, consideradas un control negativo, se seleccionaron 4 clonas al azar para estudiar, debido a que no presentaron fluorescencia.

**Tabla 2. Cantidad de clonas fluorescentes de cada línea celular transfectada**

Línea celular		Número de clonas fluorescentes
MCF-7	G1	6
	G2	6
MDA-MB-468	G1	3
	G2	3

### Evaluación de la inactivación de *CBFB* por WB

Una vez acotada la cantidad de clonas celulares a estudiar en cada grupo y línea celular, se realizó la evaluación o comprobación de la inactivación de *CBFB* en cada una de ellas. Esta evaluación se abordó a nivel del análisis de la expresión del producto proteico (producto funcional) generado por este gen. Para esto, se efectuó la extracción de proteínas totales de cada clona y el subsecuente análisis de *CBFB*, mediante WB dirigido a esta proteína, a manera de observar cambios en la cantidad de proteína expresada en cada caso.



**Figura 10. Evaluación de la inactivación de *CBFB* con sistema CRISPR-Cas 9 por WB.** A) Niveles de la proteína CBFB (22 KDa) analizados por WB para células MCF-7 Scr clona 14, G1 clona 10, G2 clona 9 y MDA-MB-468 Scr clona 2, G1 clona 2 y G2 clona 3. GAPDH (36 KDa) se analizó como control de carga. B-C) Gráficos de niveles de expresión CBFB normalizados respecto a GAPDH, calculados por densitometría, de clonas de MCF-7 (B) y clonas MDA-MB-468 (C).

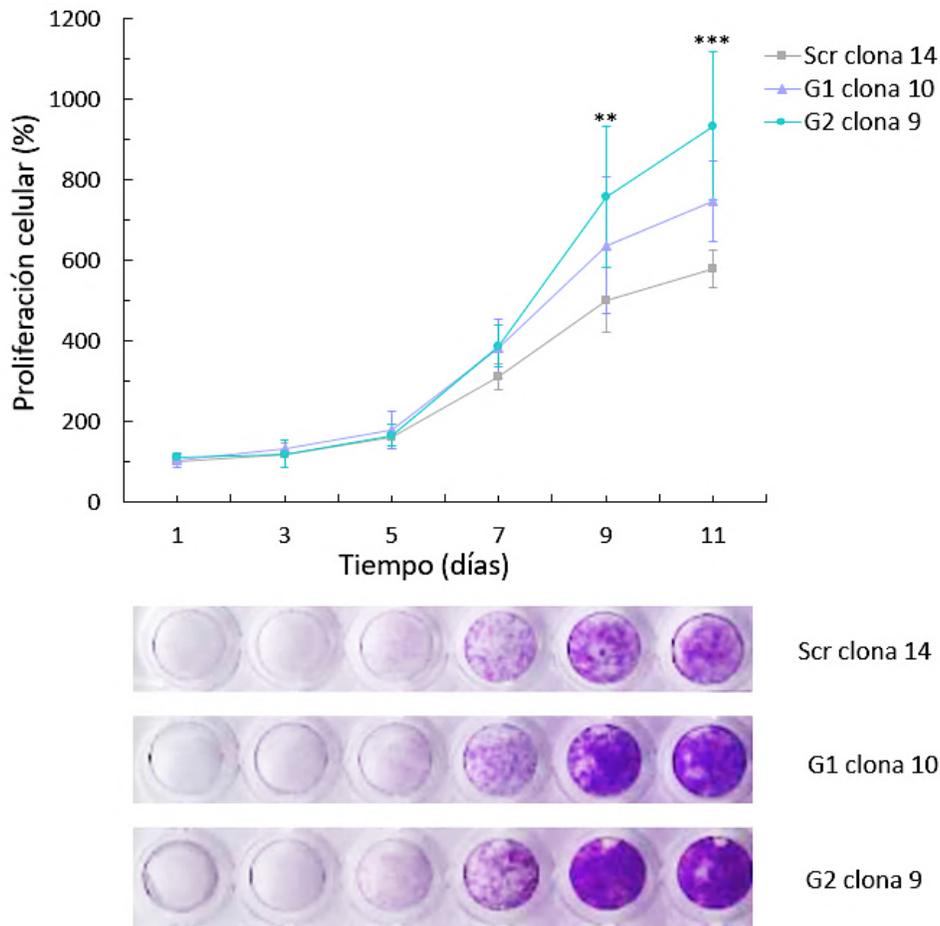
En la figura 10 A, se pueden observar diferencias en la intensidad de las bandas pertenecientes a CBFB (caracterizadas por el peso molecular=22 KDa), entre las clonas con los sgRNA que dirigen la inactivación de *CBFB* y sus respectivos controles negativos a la inactivación. Para ambas líneas celulares, se nota una disminución de la intensidad de CBFB en los grupos G1 y G2, respecto al grupo Scr. En el caso de las clonas G1 clona 10 (MCF-7), G1 clona 2 y G2 clona 3 (MDA-MB-468), se puede ver la banda de CBFB con una intensidad menor en comparación con su banda control, mientras que, en el caso particular de G2 clona 9 (MCF-7), no es posible apreciar señal alguna de CBFB en el WB, lo cual evidencia la expresión nula de esta proteína en dicha clona.

Los resultados ya descritos se pueden apreciar de una forma más clara en los gráficos de barras de la figura 10 B y C, generados del análisis densitométrico de cada banda del WB. A partir de este se determinó una disminución de la expresión de *CBFB* de poco más del 20% para G1 clona 10, del 100% para G2 clona 9 (en la línea MCF-7) y de poco más del 50% en G1 clona 2 y de más del 80% en G2 clona 3 (en MDA-MB-468).

### **Evaluación *in vitro* de los efectos de la inhibición/inactivación de *CBFB***

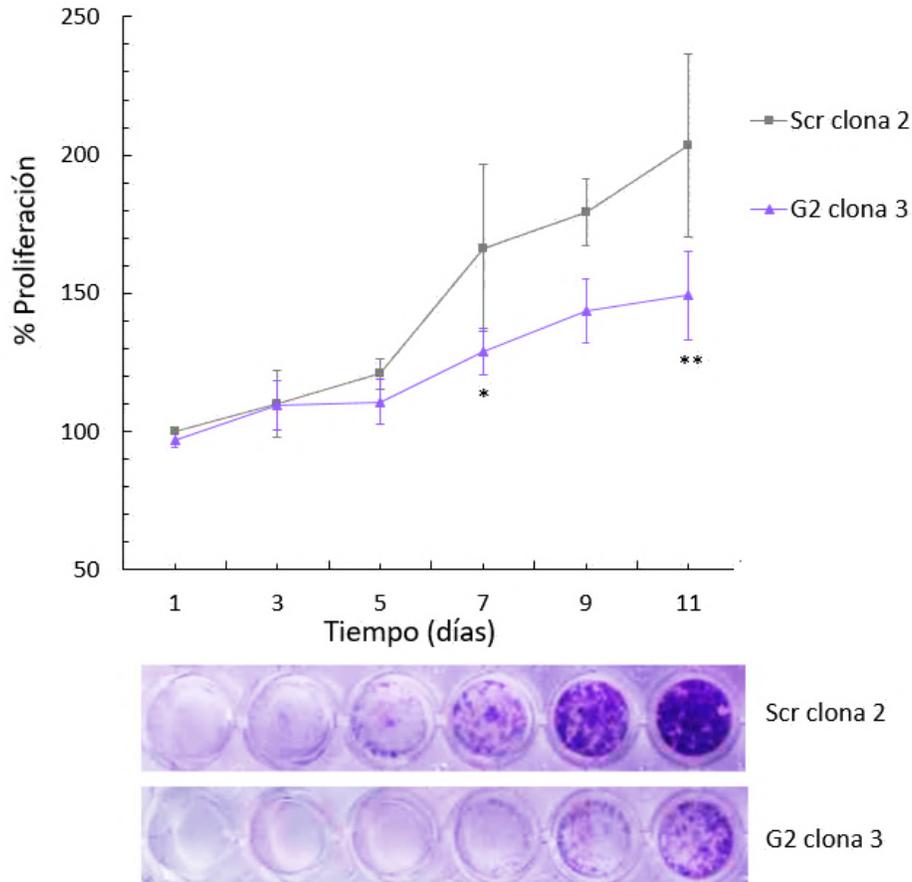
Para estudiar el papel que juega *CBFB* en el CaMa, una vez determinada la inhibición/inactivación de este gen, se evaluaron algunos aspectos íntimamente relacionados con el cáncer a nivel *in vitro*, como son la proliferación celular, la capacidad de las células de sobrevivir como clona (clonogenicidad) y la formación y crecimiento de esferoides tumorales.

En primer lugar se evaluó la proliferación celular, ya que éste es uno de los procesos que se ven alterados en cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Se comparó la proliferación de las clonas de MCF-7 con la inhibición/inactivación de *CBFB*, G1 clona 10 y G2 clona 9, y la proliferación del control Scr clona 14. En la figura 11 se muestra la curva de proliferación de las tres clonas y se puede observar un incremento en la proliferación de las clonas con inhibición/inactivación de *CBFB* respecto a la clona control. Dicho aumento es apreciable a partir del día 7 y se mantuvo a lo largo del tiempo que duró la prueba (11 días), alcanzando significancia estadística únicamente los días 9 y 11 para G2 clona 9. Cabe mencionar que se notan diferencias entre la proliferación de las clonas con *CBFB* inhibido/inactivado, las células G2 clona 9 proliferaron más en comparación con G1 clona 10. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.



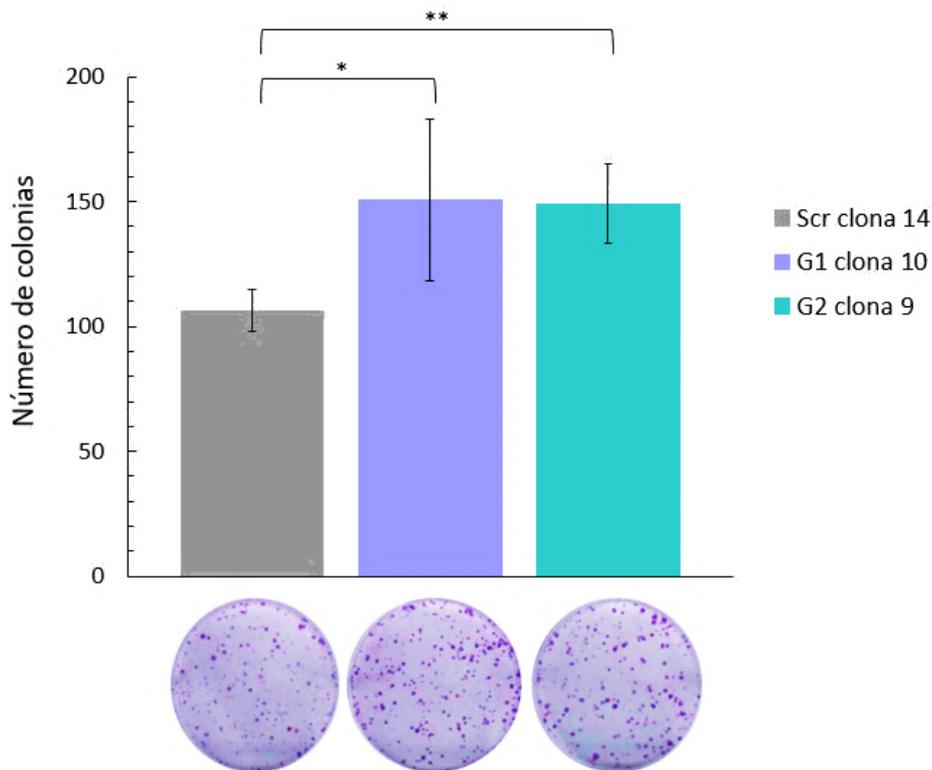
**Figura 11. Efecto de la inactivación de *CBFB* sobre la proliferación de las células MCF-7.** El gráfico representa una curva de proliferación. La proliferación celular fue monitoreada en células MCF-7 Scr clona 14 (cuadros grises), G1 clona 10 (triángulos azul verde) y G2 clona 9 (círculos lila) durante 11 días y se analizó mediante la técnica de cristal violeta. La absorbancia se registró a  $\lambda=590$  nm. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas independientes y la significancia estadística se encuentra representada como \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Se muestran bajo el gráfico las imágenes representativas de la proliferación celular de cada clona a lo largo del tiempo.

También se evaluó la proliferación de las células de la línea MDA-MB-468 con la inhibición/inactivación de *CBFB*, únicamente de G2 clona 3, en contraste con la proliferación de la clona control. Como se puede visualizar en la curva de proliferación de la figura 12, existe un comportamiento contrario a lo observado en la línea MCF-7, pues la proliferación celular en G2 clona 3 es menor respecto a la proliferación mostrada por el control (Scr clona 2). Esta disminución en la proliferación es apreciable a partir del día 5 hasta el día 11. Sin embargo, la disminución resultó significativa solamente en los días 7 y 11.



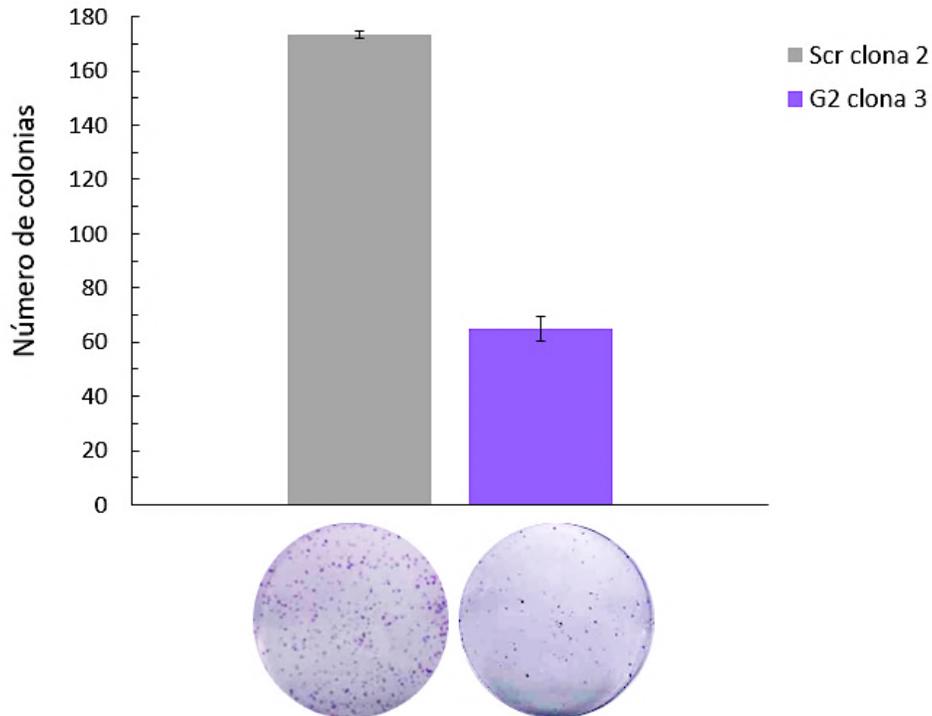
**Figura 12. Efecto de la inactivación de *CBFB* sobre la proliferación de las células MDA-MB-468.** El gráfico es una curva de proliferación de las células MDA-MB-468 Scr (cuadros gris) y G2 clona 3 (triángulos morado) que se determinó durante 11 días, mediante la técnica de cristal violeta. La absorbancia se registró a  $\lambda=590$  nm. Las barras de error representan la SD de tres réplicas independientes y la significancia estadística se encuentra representada como \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ . Se muestran bajo el gráfico las imágenes representativas de la proliferación celular de cada clona.

Por otra parte, se analizó la capacidad de cada célula para crecer y formar una colonia a través de la expansión clonal, que evidencia otra de las características de las células cancerígenas, su capacidad para sufrir una división "ilimitada" (Franken et. al, 2006). Para lo cual se realizaron pruebas de clonogenicidad en ambas líneas celulares. En la línea celular MCF-7 la capacidad clonogénica es mayor en las clonas con la inhibición/inactivación de *CBFB* que la capacidad clonogénica mostrada por la clona control (figura 13). La cantidad de colonias promedio formadas, en tres réplicas independientes, por G1 clona 10 y G2 clona 9 fue de 150 y 149, respectivamente, mientras que para Scr clona 14, fue de 110 colonias formadas. Este aumento fue estadísticamente significativo con \*  $p < 0.05$  para G1 clona 10 y \*\*  $p < 0.01$  para G2 clona 9.



**Figura 13. Efecto de la inactivación de CFBF sobre la capacidad clonogénica de las células MCF-7.** Gráfico de barras en el que se ilustra el promedio de colonias formadas por células MCF-7 Scr clona 14 (gris), G1 clona 10 (lila) y G2 clona 9 (azul-verde), posterior a 13 días de haber sido sembradas, en tres réplicas independientes. Las barras de error representan la SD de las réplicas y la significancia estadística se encuentra representada como \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ . Se muestran bajo el gráfico las imágenes de la capacidad de las células MCF-7 Scr clona 14, G1 clona 10 y G2 clona 9 para sobrevivir como una clona.

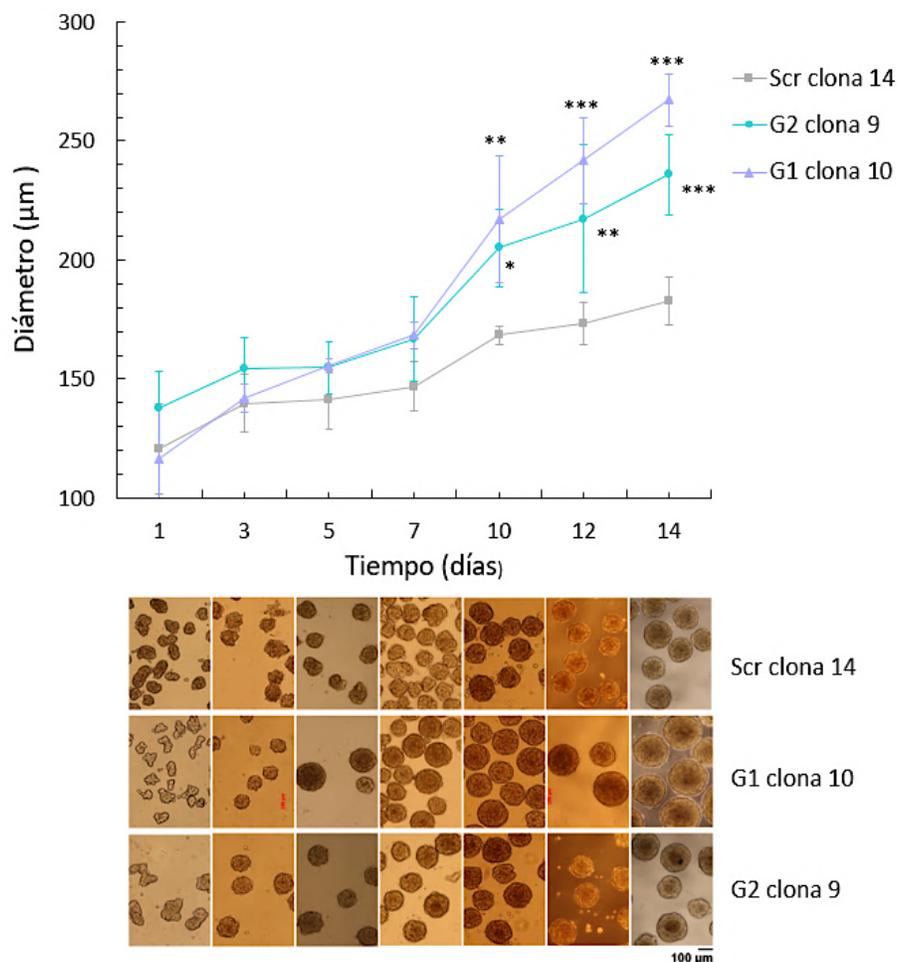
En contraste, el ensayo de clonogenicidad en los grupos de la línea MDA-MB-468, mostró una marcada disminución de la capacidad clonogénica de las células con *CBFB* inhibido comparado con la observada en la clona control (figura 14). Como puede visualizarse en el gráfico de la figura 14, la cantidad promedio de colonias formadas por G2 clona 3 (65 colonias), es más de dos veces menor que la cantidad de colonias formadas por Scr clona 2 (173 colonias). A pesar de que la disminución es muy notoria, no puede considerarse estadísticamente significativo debido a que la cantidad de réplicas biológicas es pequeña ( $n=2$ ).



**Figura 14. Efecto de la inactivación de *CBFB* sobre la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-468.** Gráfico de barras en el que se ilustra el promedio de colonias formadas por células MDA-MB-468 Scr clona 2 (gris) y G2 clona 3 (morado), posterior a 11 días de haber sido sembradas, en dos réplicas independientes. Las barras de error representan la SD de las réplicas. Abajo: Las imágenes colocadas bajo el gráfico muestran la capacidad de las células MCF-7 Scr clona 14, G1 clona 10 y G2 clona 9 para sobrevivir como una clona.

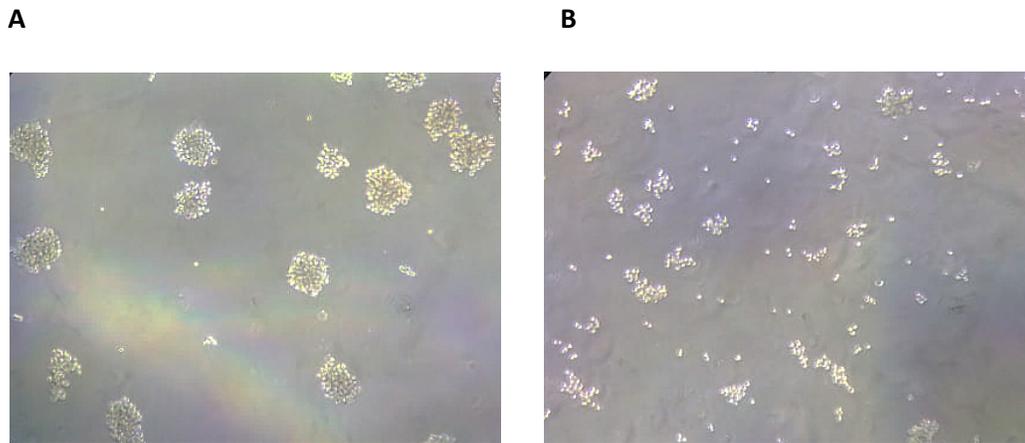
Por último, dentro de las pruebas *in vitro*, se realizaron ensayos de formación de esferoides tumorales. Los esferoides tumorales multicelulares (MTS, por sus siglas en inglés) son un modelo de cultivo tridimensional de células que refleja el estadio de crecimiento avascular inicial de tumores malignos, micrometástasis y regiones tumorales avasculares. Este modelo ha sido utilizado para comprender mejor la biología del tumor y la progresión del cáncer, así como para la investigación de metástasis e invasión y para para la detección de fármacos de alto rendimiento contra esta enfermedad (Gencoglu *et.al*, 2017; Kimlin *et.al*, 2011; Pawlik *et. al*, 2000). Se comparó la capacidad de formación y de crecimiento de MTS de las clonas con la inhibición/inactivación de *CBFB* y la clona control de ambas líneas celulares. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos para las clonas de la línea MCF-7. En primer lugar, se puede observar que tanto la clona control como las clonas experimentales formaron MTS, por lo que puede decirse que la formación de MTS no se ve afectada por la inhibición/inactivación de *CBFB*.

En segundo lugar, en la curva de crecimiento de los MTS se ven diferencias en cuanto a la cinética de crecimiento. Los MTS tanto de G1 clona 10 como G2 clona 9 exhiben un crecimiento más acelerado que los MTS de Scr clona 14, al alcanzar un diámetro promedio de 267 y 235  $\mu\text{m}$ , respectivamente, en comparación con el diámetro promedio control (183  $\mu\text{m}$ ), a los 14 días. El aumento del tamaño de los MTS es apreciable a partir del día 3 para G1 clona 10 y desde el primer día para G2 clona 9 y se mantuvo a lo largo del tiempo, alcanzando significancia estadística únicamente en los días 10, 12 y 14 para ambas clonas. Además, se notan diferencias en el crecimiento de los MTS de G1 clona 10 y G2 clona 9, al ser más grandes los esferoides de G1 clona 10 que los de G2 clona 9, sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 15. Efecto de la inhibición de *CBFB* sobre el crecimiento de esferoides multicelulares MCF-7.** El gráfico representa una curva de crecimiento de esferoides de células MCF-7 Scr clona 14 (cuadros grises), G1 clona 10 triángulos lilas) y G2 clona 9 (círculos azul-verde), basada en la medida de su diámetro. En los días 1, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 se capturaron fotografías de los esferoides y se midieron 10 esferoides por grupo utilizando el software ImageJ. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Debajo del gráfico se muestran imágenes representativas del crecimiento de los esferoides multicelulares tomados en el microscopio (objetivo 10X) durante 14 días, se observa barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, las clonas de la línea MDA-MB-468 también mostraron discrepancias en la formación y el crecimiento de MTS. Como se observa en la figura 16, la inhibición del *CBFB* afectó no solo el crecimiento de los MTS, sino su formación. Las células G2 clona 3 no formaron esferoides (figura 16 B), mientras que las células Scr clona 2 (figura 16 A) si lograron formar las estructuras de MTS. La morfología de estos esferoides fue menos compacta en comparación con la morfología mostrada por los MTS de la línea MCF-7.



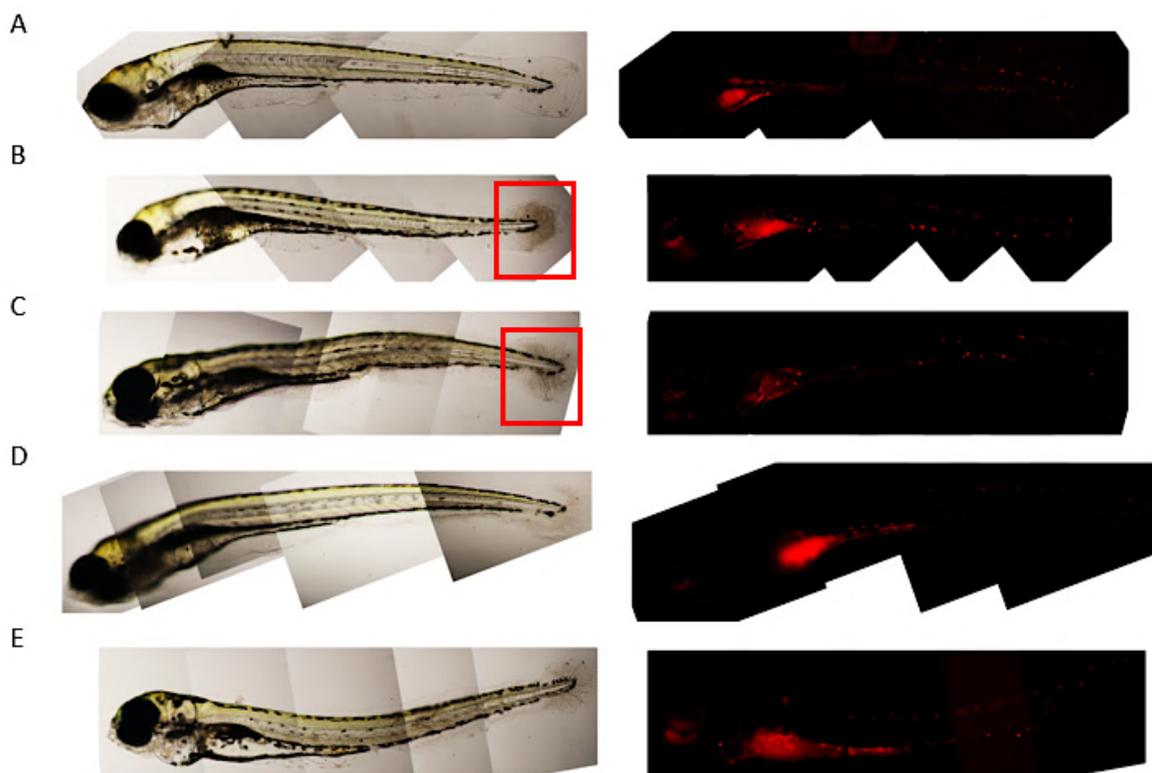
**Figura 16. Efecto de la inhibición de *CBFB* sobre el crecimiento de esferoides multicelulares MDA-MB-468.** Imágenes de los esferoides multicelulares MDA-MB -468 tomados en el microscopio de campo claro (objetivo 10X) al día 3. A) Scr clona 2; B) G2 clona 9.

### **Evaluación *in vivo* de los efectos de la inhibición de *CBFB***

Después de haber observado los efectos de la inhibición/inactivación de *CBFB* sobre procesos biológicos relacionados con la tumorigénesis mediante ensayos *in vitro*, se decidió evaluar los efectos sobre dichos procesos *in vivo*. Los estudios de trasplante de células tumorales son herramientas importantes para estudiar la biología del cáncer, especialmente la malignidad, la metástasis y la biología de las células cancerígenas, en un organismo modelo (Taylor & Zon, 2009). De tal forma que se realizaron xenotrasplantes (trasplante de células de una especie a otra diferente) de las clonas de ambas líneas celulares a embriones de pez cebra. Se pretendía evaluar la capacidad tumorigénica y de migración de las clonas con inhibición/inactivación de *CBFB* en comparación con las clonas control, sin embargo, al final la evaluación de dichos procesos no se realizó, debido a que la cantidad de células inyectadas fue muy baja como para poder observar dichos efectos. A pesar de esto, del ensayo *in vivo* se obtuvieron interesantes observaciones mostradas en la figura 17. En los embriones que fueron inyectados con células MCF-7 G1 clona 10

(figura 17 B) y G2 clona 9 (figura 17 C) se observaron cambios en la morfología de su cola, tomando en cuenta la morfología de la cola del embrión inyectado con las células control (figura 17 A). Los cambios de morfología que se pueden ver son, el desarreglo en la estructura de la cola generado por una masa de tejido con una tonalidad más oscura que la mostrada en el tejido de la cola del pez control. Cabe mencionar que, en las imágenes capturadas bajo fluorescencia, no se notan cambios en cuanto a la cantidad de células fluorescentes fuera del sitio de inyección para ambas clonas experimentales.

Es de notarse que en los embriones trasplantados con las clonas de la línea MDA-MB-468 no se observa el mismo fenómeno de desarreglo de la morfología, como en el caso de la línea celular MCF-7. Sin embargo, al observar la fotografía de fluorescencia para el embrión con células G2 clona 3 (figura 17 E) se observa una mayor cantidad de células fluorescentes fuera del sitio de inyección, respecto el embrión inyectado con células Scr clona 2 (figura 17 D). Es importante mencionar que las observaciones realizadas provienen de un solo ensayo, por lo que no se pudo afirmar que sea un fenómeno reproducible y por lo tanto real.



**Figura 17. Efecto de la inhibición de *CBFβ* en procesos relacionados con la tumorigénesis mediante ensayos *in vivo*.** Imágenes de embriones de pez cebra 4 (dpi) con 300 células MCF-7 Scr clona 14 (A), G1 clona 10 (B) y G2 clona 9 (C) y MDA-MB-468 Scr clona 2 (D) y G2 clona 3 (E). A la izquierda: imágenes de microscopio en campo claro (objetivo 10X), en los cuadros de color rojo se observan desarreglos morfológicos en la cola de los embriones. A la derecha: imágenes en microscopía de fluorescencia roja (objetivo 10X). Las células tenidas se observan como puntos rojos.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

CBFB forma parte importante del complejo proteico CBF, que funge como un factor de transcripción de genes relacionados al desarrollo (Hart & Foroni, 2002). Al igual que muchos genes críticos para el desarrollo, los genes de este complejo también se han encontrado involucrados en la carcinogénesis.

Recientemente, se han reportado alteraciones en la expresión de *CBFB* en diferentes tipos de cáncer, como cáncer hepático Miyagawa *et.al*, 2006), cervicouterino (Ojesina *et. al*, 2014) y de mama (Banerji *et. al*, 2014). Aunado a esto, nuestro grupo de trabajo en colaboración con instituciones como el Instituto Broad y la Escuela Médica de Harvard, realizó un análisis de secuenciación del genoma y el exoma completo de muestras de CaMa y encontró mutaciones inactivantes significativas en *CBFB*, específicamente en muestras positivas a RE. Por lo que, se podría relacionar este gen con el desarrollo tumoral.

En este proyecto, se investigó el papel de CBFB en el proceso tumorigénico, a partir de la inactivación del gen *CBFB* en dos líneas celulares de CaMa, MCF-7 y MDA-MB-468. La elección de éstas se realizó con base en que por una parte, los hallazgos reportados por Banerji y colaboradores en 2014 sobre las mutaciones inactivantes de *CBFB* en CaMa se relacionaron con muestras de CaMa positivas a RE y la línea MCF-7, considerada un modelo de CaMa tipo luminal A, presenta expresión de este receptor; y por otro lado, también existen estudios que relacionan a CBFB con fenotipo maligno y CaMa metastásico (Davis *et.al*, 2010) y la línea MDA-MB-468 es considerada metastásica.

La inactivación génica hace referencia a deshabilitar la función de un gen a partir de generar una versión mutada de éste para suprimir la expresión del producto funcional (Lodish *et. al*, 2005). Es importante saber que, la inactivación y regulación de la expresión génica son procesos que permiten dilucidar el papel que desempeñan los genes en la biología de la célula (Jiang & Doudna, 2017). Por tal motivo, el estudio del papel que juega CBFB en el CaMa abordó a partir de su inactivación.

La inactivación de *CBFB* se realizó con el sistema CRISPR-Cas9, con la que es posible editar la secuencia de un gen y de esta forma generar su activación o inactivación, reparar mutaciones o bien generar mutaciones de una forma dirigida (Hsu *et.al*, 2014; Jiang & Doudna, 2017). Graham & Root (2015), mencionan que la inactivación de genes con

CRISPR-Cas9 se ha convertido en un estándar aceptado para confirmar las hipótesis de la función que desempeñan éstos en el contexto celular.

El sistema CRISPR-Cas9 utilizado, como se describió en el apartado de metodología (figura 9), fue dirigido con dos sgRNA diferentes al inicio del exón 1 de *CBFB* a manera de evitar la transcripción del gen después de realizar los cambios. De forma normal, después de que el sgRNA reconoce el sitio blanco en el genoma, la nucleasa Cas9 genera un corte DSB en el DNA. Para reparar esta ruptura se pueden iniciar dos mecanismos de reparación endógenos principales: la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) propensa a errores, que a menudo conduce a la introducción de mutaciones indel (inserción/deleciones), o la reparación dirigida por homología (HDR). El HDR solo se activa en presencia de una plantilla de reparación homóloga (Boel *et. al*, 2018). Por tal motivo, se utilizó una plantilla de reparación artificial (cassette), que contenía secuencias de homología con *CBFB* para que pudiera ser utilizada como molde en la reparación, además de secuencias codificantes para genes reporteros (GFP y PuroR). Al ocurrir la HDR, teóricamente se inserta en la secuencia del gen, el cassette con dichos genes, y se desplaza el marco de lectura de *CBFB*. Ésto trae como consecuencia dos sucesos importantes, por un lado, el desplazamiento del marco de lectura de este gen genera la pérdida de la secuencia correcta del mRNA que codifica a *CBFB*, con lo cual ya no se traduce su proteína, es decir, ocurre la inactivación.

Por otra parte, se activa la expresión del gen *GFP* presente en el cassette, ya que al insertarse su expresión se regula bajo el promotor de *CBFB*; cabe mencionar que previo a la inserción la secuencia del cassette no cuenta con un promotor para su transcripción por lo que no se transcribe ni traduce *GFP*. De tal forma que únicamente las células en las que CRISPR-Cas9 se desempeñó de forma exitosa y en las que se generó HDR y se insertó el cassette, expresaron fluorescencia verde. Por este motivo se seleccionaron clonas celulares fluorescentes para evaluar la inactivación. Es de notarse que la cantidad de clonas que expresaron fluorescencia fue muy baja (tabla 2), lo que indica que la eficiencia del sistema fue baja. En este sentido, Boel y col. (2018) reportan que uno de los problemas que presentan las modificaciones mediadas por HDR inducida por CRISPR/Cas9, es que su eficiencia es relativamente baja en comparación con las alteraciones genéticas indel generadas por NHEJ. De igual forma la baja eficiencia en la inactivación, puede reflejar una transfección deficiente o sgRNA ineficientes (Bauer *et. al*, 2014).

Como se ha mencionado, en la inactivación génica se suprime la expresión del producto funcional (proteína) del gen de interés para generar pérdida de la función (Lodish *et. al*, 2005). De acuerdo a diversos autores, la evaluación de este suceso de forma

convencional se realiza con ensayos de WB para confirmar la pérdida de función de los genes mutados (Graham & Root, 2015; Ramanagoudr-Bhojappa et. al, 2018). Por lo cual, la evaluación de la inactivación de *CBFB*, se abordó realizando el análisis de los niveles de su proteína (figura 10). Para ambas líneas celulares, se observó una disminución de la expresión de *CBFB* en los grupos con los sgRNA que dirigen la inactivación, en comparación con sus respectivos controles negativos a la inactivación. En el caso específico de G2 clona 9 (MCF-7) se evidenció la expresión nula de esta proteína en dicha clona.

Para explicar lo anterior, debemos recordar que la naturaleza genética de las células somáticas es ser diploides, es decir, tienen dos juegos de cromosomas homólogos. De acuerdo a esto, es posible decir que tienen dos copias de cada cromosoma y, por lo tanto, dos copias de cada gen. A cada una de las copias de un gen se les llama alelo y éstos pueden ser o no idénticos en secuencia, es decir, se puede ser homocigoto o heterocigoto para dicho gen (Lodish et. al, 2005).

Al tener dos copias del gen *CBFB*, el sistema CRISPR-Cas9 pudo actuar en una o ambas copias y generar cambios en el gen, de forma mono o bialélica y por consecuencia generar células heterocigotas u homocigotas a la inactivación, respectivamente. De tal forma que, las células heterocigotas a la inactivación contenían un alelo silvestre de *CBFB* y el otro alelo modificado con el cassette, mientras que las células homocigotas a la inactivación contenían ambas copias modificadas. De acuerdo a Idoko-Akon y col. en 2018, la afirmación de la heterocigocidad se debe realizar comparando las secuencias de ambos alelos, de manera directa (secuenciación) o indirecta (amplificación por PCR o técnicas como RFLP) a forma de observar las diferencias en la secuencia de los alelos. Sin embargo, en este caso la homo o heterocigocidad es referente a la inactivación del gen, por lo que se relacionó con la expresión proteica. Las clonas celulares homocigotas a la inactivación no debían presentar expresión de *CBFB*, como en el caso de G2 clona 9 (MCF-7) (figura 10). Por su parte las células heterocigotas al contener un alelo funcional de *CBFB* conservarían la expresión, pero en menor grado. Tal es el caso de G1 clona 10 (MCF-7), G1 clona 2 y G2 clona 3(MDA-MB-468).

De acuerdo a Lamprecht y colaboradores 2018, el vínculo entre los genes candidatos del cáncer y la carcinogénesis puede ser estudiado a partir de modelos de pérdida de función del gen, como lo es la inactivación génica. Por consiguiente, una vez corroborada la inactivación de *CBFB* se evaluaron algunos aspectos relacionados con el cáncer a nivel *in vitro* con el fin de determinar el vínculo entre ellos. Hanahan & Weinberg en 2011, postularon diez características que comparten las células cancerosas a lo largo del desarrollo de la enfermedad, como son la proliferación acelerada, la evasión de las señales

supresoras del crecimiento, la inmortalidad replicativa y la capacidad de formar tumores, principalmente. Por lo que se decidió evaluar algunas de ellas a partir de ensayos de proliferación celular, clonogenicidad y la formación y crecimiento de esferoides tumorales.

Las células MCF-7 en las que CFBF fue inhibido/inactivado mostraron una tendencia al aumento tanto en la proliferación celular (figura 11), como en su capacidad para crecer y formar una colonia (figura 14). Además, a pesar de no mostrar una diferencia en la formación de esferoides tumorales, si observó una tendencia al aumento en el crecimiento de estas estructuras (figura 15). Estos resultados parecen indicar una relación inversa entre la función este gen y la carcinogénesis, es decir, que la inactivación de CFBF favorece los procesos relacionados al cáncer o bien, que de forma normal CFBF suprime en cierta medida estos procesos.

Además, al realizar pruebas *in vivo* en embriones de pez cebra, también se observaron cambios en la morfología de la cola del embrión, específicamente el desarreglo de su estructura, generado por una masa de tejido con una tonalidad más oscura. Este desarreglo puede deberse a la migración de las células microinyectadas a este sitio y su proliferación en gran medida. Por lo que se propone en primer lugar, realizar más réplicas biológicas para comprobar el fenómeno y realizar pruebas como inmufluorescencia sobre la cola del pez contra proteínas específicas de las células MCF-7 como ER, así como un marcador de proliferación como lo es Ki-67, para confirmar esta hipótesis.

En concordancia con los resultados obtenidos, en estudios relacionados con otros tipos de cáncer se ha observado una relación similar, en la que la disminución en la expresión de CFBF se relacionó con la progresión de lesiones precancerosas a carcinoma gástrico y hepatocelular, de acuerdo a Sakakura y col. en el 2005 y Miyagawa y col. en 2006, respectivamente.

De forma más reciente van Bragt y su grupo de trabajo en 2014, relacionaron a RUNX1, uno de los compañeros de CFBF, con el desarrollo y progresión del CaMa. Ellos observaron que ésta es la proteína RUNX expresada en mayor medida en las células mamarias, principalmente en las células luminales RE<sup>+</sup>. Mediante inhibición de la expresión de RUNX1 realizaron observaciones y postularon dos hipótesis: 1) RUNX1 es un factor de transcripción esencial para determinar el linaje luminal RE<sup>+</sup> maduro, debido a que su inhibición conlleva a una reducción profunda en esta subpoblación luminal; 2) la pérdida adicional de supresores tumorales como *p53* puede rescatar este defecto y llevar a una hiperproliferación de la población mutante, que puede eventualmente progresar a CaMa luminal ER<sup>+</sup>, al adquirir mutaciones adicionales.

A pesar de que en la investigación de Van Bragt se estudió a una de las proteínas RUNX y no a CFBF, los resultados pueden relacionarse y explicar en cierta forma lo observado en este trabajo de tesis, pues recordemos que CFBF es esencial para la mayoría de las funciones de las proteínas RUNX. Como prueba de ello, Chen y col. en 2014, demostraron que en modelos murinos de inactivación para CFBF se generan fenotipos similares a los de ratones deficientes en RUNX1. Por lo cual, un posible mecanismo a través del que la pérdida de CFBF favorece los procesos relacionados al cáncer, puede ser la disminución de la función de las proteínas RUNX, especialmente RUNX1, por deficiencia de su regulador CFBF.

En adición, en estudios recientes de secuenciación de genoma completo y exoma, las mutaciones de *RUNX1* y *CBFB* solo se identificaron en el subtipo luminal de CaMa que son típicamente ER<sup>+</sup> (Banerji *et al*, 2014; Ellis *et al.*, 2012). Cabe resaltar que la línea celular MCF-7 es considerada un modelo de CaMa luminal A, porque expresa RE.

Por otra parte, en las células MDA-MB-468 con inhibición de *CBFB* se observó una tendencia a la disminución de la proliferación celular, así como de la capacidad de expansión clonal. Además, en el caso de esta línea celular la inhibición del *CBFB* afectó no sólo el crecimiento de los MTS, sino que también afectó su formación. Por lo que de forma contraria a lo observado en la línea MCF-7, CFBF parece tener un papel importante en el mantenimiento de los procesos relacionados al cáncer.

Además de los estudios revisados anteriormente que postulan un papel supresor tumoral por parte de CFBF y en general del complejo CBF, existen diversos reportes sobre su intervención en la progresión tumoral. Davis y colaboradores en el 2010, demostraron en células de cáncer prostático y ovárico que CFBF tiene papel regulador del fenotipo maligno, postulando que su expresión es requerida para dicho fenotipo. Estos resultados fueron obtenidos a partir de la inhibición de CFBF en líneas celulares de cáncer de próstata y cáncer ovárico y observaron que se revierte el fenotipo maligno al disminuir modestamente la capacidad proliferativa, perder su capacidad de crecer como clonas y de crecer de forma independiente de anclaje (como en el modelo de MTS). Además, también observaron una disminución en la formación de tumores en ratones y a partir de análisis de expresión génica, demostraron cambios en los patrones de expresión de genes relacionados a malignidad, como cadherinas (moléculas de adhesión celular) y principalmente genes con sitios de unión de las proteínas RUNXs. Esta última observación podría indicar el mecanismo a partir del cual CFBF modula el proceso tumoral.

Otro estudio concordante con lo observado en la línea MDA-MB-468 (línea metastásica) y específicamente en CaMa, es el realizado por Mendoza-Villanueva y su

grupo en 2010. En su estudio demuestran que CBF $\beta$  se expresa en las células de cáncer de mama metastásicas, MDA-MB-231, y que se asocia con RUNX2, que se encuentra sobre-expresada en CaMa metastásico. Además, a partir de la inhibición del gen se realizaron ensayos de invasión celular y análisis de expresión génica, y demostraron que CBF $\beta$  es esencial para la invasión celular y para la expresión de varios genes objetivo de RUNX2 que se sabe están involucrados en este proceso. También Carlton y colaboradores en 2018, demostraron que la inhibición de la interacción CBF $\beta$  / RUNX2 disminuye la proliferación celular del cáncer de ovario, así como la capacidad de migración y el crecimiento independiente del anclaje al inducir cambios en la expresión de genes relacionados con la proliferación y la transición epitelio-mesénquima.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos en este proyecto y a lo reportado en trabajos previos, el papel que CBF $\beta$  desempeña en el CaMa parece ser dependiente del contexto celular, específicamente del tipo de células mamarias en las que se desarrolle la patología. Por un lado, CBF $\beta$  desempeña un papel supresor de tumores en el contexto de células luminales ER<sup>+</sup>, al participar en el programa de diferenciación y maduración de esta estirpe celular. Pues su inactivación en la línea MCF-7, considerada luminal RE<sup>+</sup>, favoreció los procesos relacionados al cáncer.

En otro sentido, CBF $\beta$  desempeña un papel protumorigénico en el contexto de células que no expresan RE y específicamente consideradas metastásicas, al mantener el fenotipo maligno y contribuir con la transición epitelio-mesénquima. Ya que su inactivación en la línea MDA-MB-468, células metastásicas RE<sup>-</sup>, disminuyó los procesos asociados a cáncer estudiados en este trabajo.

## IX. CONCLUSIONES

---

- El gen *CBFB* se inactivó mediante la técnica de CRISPR-Cas9 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468.
- Se comprobó la inactivación de *CBFB*, a través de la técnica de Western Blot, por la disminución de la cantidad de su producto proteico. En adición, se determinó que la inactivación se realizó a dos niveles diferentes, monoalélico y bialélico y por consecuencia se obtuvieron células heterocigotas y homocigotas a la inactivación, respectivamente.
- De forma *in vitro*, se determinó que la reducción en la expresión de *CBFB* en la línea MCF-7 resulta en el aumento de la proliferación celular, la capacidad clonogénica y aumento en el tamaño de los esferoides tumorales. Mientras que la inactivación de *CBFB* en la línea MD-MB-468 generó un efecto contrario, al disminuir la capacidad proliferativa, clonogénica y de formación de esferoides tumorales.
- No fue posible determinar el efecto que la inactivación de *CBFB* tiene sobre la capacidad de formar tumores *in vivo*, a partir de xenotrasplantes a embriones de pez cebra. Sin embargo, se observaron desarreglos en la morfología de la cola de los embriones inyectados con la línea MCF-7 con *CBFB* inactivado. Se postula que este fenómeno puede deberse a la migración de las células inyectadas y su proliferación y se propone comprobar la reproducibilidad del fenómeno y realizar pruebas para confirmar esta hipótesis.
- Con todos los resultados obtenidos en este trabajo, se determinó que el papel que *CBFB* desempeña en el CaMa parece ser dependiente del contexto celular, específicamente del tipo de células mamarias en las que se desarrolle la patología. Por una parte, *CBFB* desempeña un rol supresor de tumores en el contexto de la línea MCF-7 (células luminales ER<sup>+</sup>), mientras que en el contexto de la línea MDA-MB-468 (células consideradas metastásicas), *CBFB* desempeña un papel protumorigénico.

## X. PERSPECTIVAS

---

- A manera de comprobar lo observado de forma *in vitro*, se propone nuevamente realizar los ensayos de tumorigénesis *in vivo* para observar el efecto que tiene la inactivación de *CBFB*.
- No se habían reportado antes desarreglos en la morfología de la cola de embriones de pez cebra inyectados con células de cáncer. Por lo que se propone en primer lugar, realizar más replicas biológicas del ensayo para comprobar la reproducibilidad del fenómeno. Además de realizar ensayos de inmunofluorescencia sobre la cola del pez contra proteínas específicas de las células MCF-7, como ER, así como un marcador de proliferación, como Ki-67, para confirmar que los desarreglos son a causa de la migración y proliferación de estas células.
- Determinar las vías de señalización en las participa *CBFB* y confirmar los mecanismos por los que *CBFB* tiene un papel supresor tumoral y protumorigénico, en cada contexto celular, para lo cual se propone realizar análisis de expresión génica de las células con *CBFB* inactivado.

## XI. REFERENCIAS

---

- American Cancer Society. (2018). *Aspectos generales del cáncer*. Consultado el 23 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer.html>
- Banerji, S.; Cibulskis, K.; Freeman, S. et.al. (2014). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486 (7403): 405–409.
- Bauer, D.; Canver, M.; Orkin, S. (2014). Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. *J. Vis. Exp.*, 83: e52118.
- Beadve, J.; Dabbs, D. & Snchnitt, S. (2011). Basal-like and Triple Negative Cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologist and oncologist. *Modern Pathology*, 24: 157-167.
- Biswas, D.; Shi, Q.; Baily, 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.
- Bieche, I.; Champeme, M.; Matifas, F. et. al. (1993). Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Res*, 53:1990–1994.
- Birnbaum, D.; Adelaide, J.; Mamessier, E. et. al. (2011). Genome profiling of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 50: 456–65.
- BCSC. (2000). *Types of breast cancer*. Consultado el 06 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://bcsc.ca/p/41/l/506/t/Breast-Cancer-Society-of-Canada---Types-of-Breast-Cancer>
- Boel, A.; De Saffel, H.; Steyaert, W. et. al. (2018). CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by ssODNs in zebrafish induces complex mutational patterns resulting from genomic integration of repair-template fragments. *Disease models & mechanisms*, 11(10): dmm035352.
- Boxer, L. & Dang, C. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*, 20: 5595–5610

- Carlton, A.; Illendula, A.; Gao, Y. et. al. (2018). Small molecule inhibition of the CBF $\beta$ /RUNX interaction decreases ovarian cancer growth and migration through alterations in genes related to epithelial-to-mesenchymal transition. *Gynecol Oncol.*, 149(2): 350-360
- Centro médico ABC. (2018). *Glándula mamaria*. Consultado el 06 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://www.abchospital.com/que-es-la-glandula-mamaria/>
- Chen, L. (2012). Tumor Suppressor Function of RUNX3 in Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113: 1470–1477.
- Chen, W. et al. (2014). Cbf $\beta$  deletion in mice recapitulates cleidocranial dysplasia and reveals multiple functions of Cbf $\beta$  required for skeletal development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 111: 8482–8487
- Chimge, N. & Frenkel, B. (2013). The RUNX family in breast cancer: relationships with estrogen signaling. *Oncogene*, 32: 2121-2130.
- Chuang, L.; Ito, K.; Ito, Y. (2012). RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *Int. J. Cancer*, 132: 1260–1271
- Davis, N.; Rogers, D.; Adams, L. et. Al. (2010). Association of core-binding factor  $\beta$  with the malignant phenotype of prostate and ovarian cancer cells. *J Cell Physiol*, 225(3): 875-87.
- Ellis, M.; Ding, L.; Shen, D. et. al. (2012). Whole genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, 486: 353–360.
- Endo, T.; Ohta, K.; Kobayashi, T. (2008). Expression and function of Cbfa-1/Runx2 in thyroid papillary carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2409–2412.
- Eroles, P.; Bosch, A.; Perez-Fidalgo, J.; Bunch, E. (2012). Molecular biology in Breast Cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38: 698-707.
- Faraoni, I. & Graziani, G. (2018). Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors. *Cancers*, 10 (12): 487
- Franken, N.; Rodermond, H.; Stap, E. et. al. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1: 2315-2319.

- Fu, M.; Wang, Li, Z. *et.al.* (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*, 145 (12): 5439
- Gencoglu, M.; Barney, L.; Hall, C. *et. al.* (2017). Comparative study of multicellular tumor spheroid formation methods and implications for drug screening. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4 (2): 410-420.
- González-Niño, L.; Ávila-Garavito, A.; Echeverria-Jaramillo, C. *et.al.* (2007). Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*, 11 (1):40-57.
- Graham, D. & Root, D. (2015). Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biology* 16 (1): 260-281.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144 (5): 646–674.
- Hart, S. & Foroni, E. (2002). Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica*, Vol. 87(12):1307-1323.
- Holliday, D. & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13 (4): 215.
- Huang, X.; Peng, J.; Speck, N. *et.al.* (1999). Solution structure of core binding factor  $\beta$  and map of the CBF $\alpha$  binding site. *Rev. Nature structural biology*, 6 (7): 624-627.
- Hsu, P.; Lander, E. & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6):1262-78.
- Idoko-Akoh, A.; Taylor, L.; Sang, H. *et. al.* (2018). High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells. *Scientific reports*, 8(1): 15126.
- IARC. (2018). *Cancer today*. Consultado el 10 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>
- Ito, Y.; Bae, S. & Huey, L. (2015). The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nature reviews cancer*, 15 (2): 81-95.

- Jacob, B.; Osato, M.; Yamashita, N. et. al. (2010). Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood*, 115: 1610-1620.
- Javed, A.; Barnes, G.; Pratap, J. et. al. (2005). Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 1454-1459.
- Jiang, F. & Doudna, J. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.*, 46: 505–529
- Kayed, H.; Jiang, X.; Keleg, S. et al. (2007). Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 97: 1106–1115.
- Kimlin, L.; Casagrande, G. & Virador, V. (2011). In Vitro Three-Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. *Molecular Carcinogenesis*, 52 (3): 167-182.
- Liu, Y.; Carmer, R.; Zhang, G. et.al. (2015). Statistical Analysis of Zebrafish Locomotor Response. *PloS one*, 10 (10): e0139521.
- Liu, P.; Tarlé, S.; Hajra, A. (1993). Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*, 261(5124): 1041-4.
- Lamprecht, U.; Horvat, S. & Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Frontiers in Oncology*, 8 (268): 1-18.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P. et.al. (2005). *Biología celular y molecular*. 5a. Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. p. 353, 387-388.
- Mendoza-Villanueva, D.; Deng, W.; Lopez-Camacho, C. et. al. (2010). The Runx transcriptional co-activator, CBFbeta, is essential for invasion of breast cancer cells. *Molecular cancer*, 9, 171.
- Miyagawa, K.; Sakakura, C.; Nakashima, S. et. al. (2006). Down-regulation of RUNX1, RUNX3 and CBF, in Hepatocellular Carcinomas in an Early Stage of Hepatocarcinogenesis. *Anticancer research*, 26: 3633-3644.
- NCBI. (2017). *CBFB core-binding factor beta subunit [Homo sapiens (human)]*. Consultado el 22 de noviembre de 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/865>

- Niki, M.; Okada, H.; Takano, H. et.al. (1997). Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5697-5702
- Ojesina A.; Freeman, S.; Peadarallu, C. (2013). Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*, 506 (7488): 371-375.
- Parsa, Y.; Mirmalek, S.; Kani, F. et.al. (2016). A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. *Electron physician*, 8 (5): 2416-2424.
- Pawlik, T.; Souba, W.; Sweeney, T. et.al. (2000). Amino Acid Uptake and Regulation in Multicellular Hepatoma Spheroids. *Journal of Surgical Research*, 91: 15–25.
- Perou, C.; Sorlie, T.; Eisen, M. et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752.
- Polyak, R. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 117:3155-3163
- Ramanagoudr-Bhojappa, R.; Carrington, B.; Ramaswami, M. et. al. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of 19 Fanconi anemia pathway genes in zebrafish revealed their roles in growth, sexual development and fertility. *PLOS Genetics*, 14(12): e1007821.
- Ramaswamy, S.; Ross, K.; Lander, E. et. al. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 33: 49-54.
- Richards, J. & Hawley, R. (2011). *The human genome, a user's guide*. 3a Ed. USA: Elsevier. p. 345-346
- Sabatier, R.; Finetti, P.; Guille, A. et. al. (2014). Claudin-Low Cancers: clinical, pathology, molecular and prognostic characterization. *Molecular Cancer*, 13: 228.
- Sakakura, C.; Hagiwara, A.; Miyagawa, K. et al. (2005). Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor CBFβ in gastric cancer. *International journal of cancer*, 113: 221-228.
- Sase, T.; Suzuki, T.; Miura, K. et. al. (2012). Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) in human colon carcinoma: a potent prognostic factor associated with estrogen receptor. *Int J Cancer*, 131 (10): 2284-2293.

- SSA. (2015). *Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino*. Consultado el 10 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- SSA. (2017). *Cáncer, tercera causa de muerte en México*. Consultado el 24 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
- Sørlie, T.; Perou, C.; Tibshirani, R. et. al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10869-10874.
- Taylor, A. & Zon, L. (2009). Zebrafish Tumor Assays: The State of Transplantation. *Zebrafish*, 6 (4): 339-346.
- Tran, B. & Bedard, P. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research*, 13: 221.
- UniProtKB. (s.f.). Q13951 (PEBB\_HUMAN). Consultado el 22 de noviembre de 2018. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13951>
- van Bragt, M.; Hu, X.; Xie, Y. et.al. (2014). RUNX1, a transcription factor mutated in breast cancer, controls the fate of ER-positive mammary luminal cells. *eLife*, 3: e03881
- Wang, H.; La Rusa, M. & Qi, L. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem*, 85: 227-264.
- Wang, Q. et al. (1996). The CBF $\beta$  subunit is essential for CBF $\alpha$ 2 (AML1) function in vivo. *Cell*, 87: 697–708.
- Weinberg, R. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, 275 (3): 62-70.
- Weinberg, R. (2014). *Biology of Cancer*. 2a ed. USA: Garland Science. p. 31,32, 439.
- Zhang, L.; Lukasik, S.; Speck, A. et.al. (2003). Structural and functional characterization of Runx1, CBF  $\beta$ , and CBF  $\beta$  -SMMHC. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 30: 147-156.

Zhao, X.; Chen, A.; Yan, X. et.al. (2016). Downregulation of RUNX1/CBF $\beta$  by MLL fusion proteins enhances hematopoietic stem cell self-renewal. *Rev. Blood*, 123 (11):1721-1738.