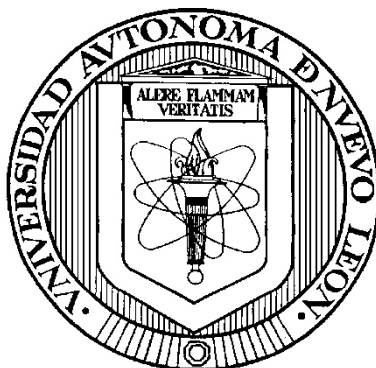


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *FOXC1* EN LA TRANSICIÓN
EPITELIAL-MESENQUIMAL EN CÁNCER DE MAMA**

POR

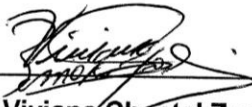
IBT BIANKA DIANEY CAMACHO ZAMORA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

AGOSTO, 2017

Papel del factor de transcripción FOXC1 en la transición Epitelio-Mesenquimal en cáncer de mama.

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Directora de Tesis



Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez

Co-Director de Tesis



Dr. C. Alberto Camacho Morales

Miembro de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Estructural del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como en el Laboratorio de Neurociencias y Genética de la Universidad de Monterrey bajo la dirección de la Dra. C. Viviana Zomosa Signoret, la co-dirección del Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez y como miembro de la comisión el Dr. C. Alberto Camacho Morales.

“En cuestiones de ciencia, la autoridad de miles no vale más que el humilde razonamiento de un único individuo.”

Galileo Galilei

Agradecimientos

CONACyT, gracias por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible realizar este proyecto de tesis.

A mi **comisión de tesis** Dra. Viviana, Dr. Román y Dr. Alberto, gracias por sus enseñanzas y atenciones durante este tiempo.

Dra. Rocío Ortiz, gracias por seguir adelante con este proyecto pese a las adversidades y hacerme sentir parte de su equipo de trabajo.

A **mi familia**, quienes me han educado con amor y dedicación, que me motivan a seguir adelante con mis propósitos para alcanzar el éxito, que siempre han confiado que tendré. Los amo.

Familia Miranda Rangel cada uno de ustedes me ha reconfortado y me han integrado a su linda familia. Siempre estaré muy agradecida con todos especialmente contigo Gerardo, los amo.

Departamento de Bioquímica, gracias a Juany, Ariadna, Normita, Cecy, Elda y Larisa quienes siempre estuvieron con disposición a ayudarme en lo que estaba a su alcance.

A la **Unidad de Genómica**: Liz, Sandra, Laura, Paty, Geo, Adriana, Ernesto, José Ramón, Grecia, Carlos, Maribel y Juanny, quienes me enseñaron lo que sé de cómo trabajar en el laboratorio desde mucho antes de entrar a la maestría. Muchísimas gracias a todos por su paciencia, cariño y amistad.

A mis **morfocitos** Aby, Jose Juan, Sheila, Ana y David que siempre me dieron un lugar en histología y siempre fui bienvenida.

Ana Victoria, contigo aprendí a andar en combo y preocuparme más por todo, gracias por ser tan honesta y abierta conmigo.

Gracias **Estefanía** y **Daniel** porque en ustedes he encontrado más de lo que puedo pedir en un amigo y sé que puedo confiar en ustedes completamente.

A mi madre...

Índice de contenido

Lista de abreviaturas.....	9
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras	13
.....	14
INTRODUCCIÓN	15
Cáncer	15
Cáncer de mama	16
El cáncer de mama triple negativo	17
Las proteínas Forkhead Box.....	19
Forkhead Box C1	20
FOXC1 en el desarrollo embrionario	21
La transición epitelial mesenquimal.....	22
EMT en la progresión del cáncer y metástasis.....	23
CDH1.....	25
Antecedentes directos	27
FOXC1 y el cáncer de mama triple negativo	27
FOXC1 y la transición epitelial mesenquimal	28
Justificación	29
Pregunta de investigación.....	30
Hipótesis de trabajo	30
Objetivos.....	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos.....	31

Materiales y métodos.....	32
Líneas celulares	32
Materiales y reactivos	32
Equipos utilizados.....	33
Estrategia general:.....	34
Ensayo de silenciamiento de FOXC1	34
Ensayo de sobreexpresión de FOXC1	35
Extracción de RNA de líneas celulares con Purezol.....	36
Purificación de RNA por columna RNeasy Mini Elute Kit de QIAGEN	37
Obtención de cDNA por retrotranscripción	38
Obtención de la eficiencia y estabilidad de gen endógeno para ensayo de expresión de marcadores de transición epitelial-mesenquimal	39
Eficiencia de la reacción.....	40
Estabilidad del gen endógeno	40
Ensayo de expresión relativa de FOXC1 mediante qPCR.....	40
Ensayo invasión celular en tercera dimensión.....	41
Resultados.....	42
Ensayo de silenciamiento de FOXC1	42
Ensayo de sobreexpresión de FOXC1	44
Obtención de la eficiencia y estabilidad de gen endógeno para ensayo de expresión de marcadores EMT.....	46
Eficiencia de la reacción.....	46
Estabilidad del gen endógeno	46
Expresión de los marcadores EMT en las líneas con sobreexpresión y silenciamiento.....	46

Silenciamiento de FOXC1	46
Sobreexpresión de FOXC1	48
Ensayo de invasión celular en tercera dimensión.....	49
Discusión	53
Conclusiones	59
Aportaciones	60
Perspectivas	60
Referencias:.....	61

Lista de abreviaturas

μg - microgramo

μl - microlitro

Amp - Ampicilina (Antibiótico)

BCL11A - B-Cell CLL/Lymphoma 11A

BLBC - Basal-Like Breast Cancer (Cáncer de mama tipo basal)

BRCA1 - Breast cancer 1

BSL2 - Biosafety Level 2 (Nivel de bioseguridad 2)

CDH1 - Cadherin 1 (E-Cadherina)

CDH2 - Cadherin 2 (N-Cadherina)

cDNA - complementary DNA (DNA complementario)

CMTN (TNBC) - Cáncer de mama triple negativo

CMV - Citomegalovirus

CO₂ - Dióxido de carbono

DEPC - Dietil pirocarbonato

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Deoxynucleotide (Deoxinucleótido)

EGF - Epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidérmico)

EMT - Epithelial to mesenchymal transition (Transición epitelial- mesenquimal)

FN1- Fibronectin (Fibronectina 1)

FOXA1 - Forkhead Box A1

FOXA2 - Forkhead Box A2

FOXC1 – Forkhead box C1

FOXC2 - Forkhead Box C2

FOXF1 – Forkhead Box F1

FOXO3A - Forkhead Box O3A

FOXQ1 - Forkhead Box Q1

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP - Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)

HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2 (Receptor 2 del factor del crecimiento epidermal humano)

HMGA1 High Mobility Group AT-Hook 1

LPIN1 - Phosphatidate Phosphatase LPIN1

m - pendiente de la recta

mg - mili gramos

MMP7 - Metaloproteasa 7

nCMTN (nTNBC) - non Triple Negative Breast Cancer (Cáncer de mama no triple negativo)

Neo - Neomicina (Antibiótico)

ng - nanogramos

OMS - Organización Mundial de la Salud

OptiMEM - Reduced Serum Media of Eagle's Minimum Essential Media

ORF - Open reading frame (Marco de lectura abierto)

PCR - Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PRKX - Protein Kinase, X-Linked (Proteín cinasa ligada al X)

qPCR - quantitative Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

RE - Receptor de estrógenos

RNA - Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

RP - Receptor de progesterona

SNAI1 - Snail Family Transcriptional Repressor 1 (Snail)

SNAI2 - Snail Family Transcriptional Repressor 2 (Slug)

TE - Tris-EDTA buffer

TJP1 - Tight Junction Protein 1 (ZO-1)

TNP - Triple Negative Phenotype (Fenotipo Triple Negativo)

UGT8 - UDP Glucosiltransferasa 8

VIM - Vimentina

Índice de Tablas

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas y su clasificación basada en el subtipo de cáncer de mama.	32
Tabla 2. Componentes de reacción de Retrotranscripción en un volumen final de 20µl.	38
Tabla 3. Condiciones utilizadas para retrotranscripción.....	38
Tabla 4. Componentes de la reacción de qPCR con un volumen final de 10 µl	39
Tabla 5. Condiciones del ensayo de qPCR.	39
Tabla 6. Rendimiento de RNA de ensayo de silenciamiento.	42
Tabla 7. Rendimiento RNA de ensayo de sobreexpresión.	44

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de calor de estudio comparativo TNBC vs nTNBC tomado de Santuario-Facio, 2012.....	18
Figura 2. Diagrama de las funciones de FOXC1 en procesos biológicos y patológicos.....	20
Figura 3. Fases y marcadores de la EMT tomado de Kalluri, 2009.	22
Figura 4. Mapa del vector RG215629 con sitio ORF de FOXC1.....	35
Figura 5. Resultados expresión relativa FOXC1 después del silenciamiento 24, 48, y 72 horas.	43
Figura 6. Expresión relativa de FOXC1 después del silenciamiento ensayo placa de 6 pozos a las 48h.....	44
Figura 7. Expresión relativa de FOXC1 después del silenciamiento.....	45
Figura 8. Expresión EMT en MDAMB231 con silenciamiento de FOXC1.....	47
Figura 9. Expresión EMT en HCC1395 con sobreexpresión de FOXC1.....	48
Figura 10. Evaluación de la formación del esferoide e invasión línea HCC1395.	49
Figura 11. Evaluación de la invasión celular con la sobreexpresión de FOXC1.	50
Figura 12. Evaluación de la formación del esferoide e invasión de la línea MDAMB231.....	51
Figura 13. Evaluación de la invasión en línea MDAMB231 con silenciamiento de FOXC1.....	52

RESUMEN

IBT Bianca Dianey Camacho Zamora

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de graduación: Septiembre 2017

Introducción: El cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres de México, se ha clasificado en cuatro subtipos principales. Los pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) generalmente jóvenes, descendientes de afroamericanos y latinos, sufren una alta tasa de metástasis a cerebro y pulmón. Recientemente, el factor de transcripción Forkhead Box C1 (FOXC1) fue identificado como biomarcador potencial para este subtipo de cáncer, una alta expresión se correlaciona con pobre sobrevida.

En la actualidad, el mecanismo exacto por el cual los tumores BLBC son tan agresivos y proliferan tan rápido no se ha elucidado. La transición epitelial mesenquimal (EMT) es un proceso por el cual las células epiteliales pierden su morfología apico-basal, dejando su fenotipo epitelial adquiriendo un fenotipo mesenquimal con alta migración e invasión. FOXC1 se ha relacionado con este proceso en muchos otros tipos de cáncer.

Objetivo: Determinar el papel de FOXC1 en la transición Mesenquimal-Epitelial en TNBC.

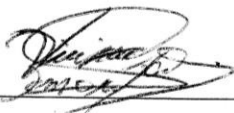
Materiales y Métodos: Se empleó la línea celular MDAMB231 como modelo de TNBC y se silenció el gen FOXC1 con siRNA de Thermo Fisher Scientific. Con la línea HCC1395 se utilizó el plásmido CMV-FOXC1 para su sobreexpresión transfectando con el agente Xfect (Clontech). Se obtuvo la expresión génica con sondas de hidrólisis evaluando marcadores de EMT (VIM, FN1, CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2, MMP7, TJP1) y GAPDH como endógeno. Se determinó la invasión celular mediante un ensayo de cultivo celular en tercera dimensión.

Resultados: El porcentaje de silenciamiento del gen FOXC1 fue del 65% y se correlaciona con los marcadores EMT tales como Cadherina-E, Vimentina y Slug al inhibir su expresión. Los niveles de expresión de Fibronectina y Snail no se relacionan con la expresión de FOXC1. MMP7, N-Cadherina y TJP1 no cambiaron sus niveles de expresión.

La mayor sobreexpresión de FOXC1 se observó a las 48 horas y se obtuvieron los marcadores de la EMT afectando tanto en el silenciamiento como en la sobreexpresión a CDH1, FN1, SNAI2 y VIM.

Se observó que la capacidad de invasión de las células se vio afectada por la expresión de FOXC1, al disminuir la expresión de FOXC1 también disminuye la invasión celular.

Conclusión: La sobreexpresión y el silenciamiento de la expresión de FOXC1 correlacionó con los niveles de 4 marcadores principales (FN1, CDH1, SNAI2 y VIM) de la EMT, no se observó diferencia significativa en el resto. La expresión de FOXC1 afecta la invasión celular en un modelo in vitro de cultivo celular en tercera dimensión. FOXC1 es un gen que afecta a EMT, pero no es el único regulador maestro en este proceso en cáncer de mama.



Dra. C. Viviana Zomosa Signoret

Director de tesis

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que involucran un crecimiento descontrolado de células con el potencial de invadir otras partes del cuerpo que en su conjunto induce la formación un subconjunto de neoplasias. Una neoplasia o tumor es un grupo de células que han sufrido un crecimiento no regulado y que a menudo constituyen una masa o bulto, pero pueden distribuirse difusamente (American Cancer Institute, 2017b; Choices, 2017).

El cáncer es fundamentalmente una enfermedad de la regulación del crecimiento tisular. Para que una célula normal se transforme en una célula cancerosa, los genes que regulan el crecimiento y la diferenciación celular deben estar alterados (Croce, 2008). La transformación maligna puede ocurrir mediante la formación de nuevos oncogenes, la sobreexpresión inadecuada de oncogenes normales, o por la su expresión o desactivación de genes supresores de tumores. Típicamente, se requieren cambios en múltiples genes para transformar una célula normal en una célula cancerosa (Knudson, 2001).

Los signos y síntomas incluyen un bulto, sangrado anormal, tos prolongada, pérdida de peso inexplicable y un cambio en los movimientos intestinales. Aunque estos síntomas pueden indicar cáncer, pueden tener otras causas. Más de 100 tipos de cánceres afectan a los seres humanos. Éste puede ser detectado por ciertos signos y síntomas o pruebas de diagnóstico. Subsecuentemente, se investiga detalladamente mediante imágenes médicas y se confirma mediante biopsia (American Cancer Society, 2017)

En 2015, alrededor de 90,5 millones de personas tenían cáncer (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016), alrededor de 14,1 millones de nuevos casos ocurren al año, además causó alrededor de 8,8 millones de muertes (15,7%).

El riesgo de cáncer aumenta significativamente con la edad y muchos cánceres ocurren más comúnmente en los países desarrollados (American Cancer

Institute, 2017). Las tasas de mortalidad han aumentado a medida que más personas alcanzan la vejez y también se asocian a los cambios de estilo de vida que ocurren en el mundo en desarrollo (Jemal et al., 2011).

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, consiste en una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Los factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama incluyen padecer, obesidad, falta de ejercicio físico, beber alcohol, terapia de reemplazo hormonal durante la menopausia, radiación ionizante, edad temprana a la primera menstruación, edad avanzada e historia familiar (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002). Aproximadamente 5-10% de los casos se deben a genes heredados de los padres incluyendo los genes BRCA1 y BRCA2, entre otros (Duncan, Reeves, & Cooke, 1998).

Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo conforme a lo reportado por la OMS en el 2004. Según datos de INEGI de 2017, el cáncer de mama tiene el primer lugar en morbilidad hospitalaria, concentrándose en el norte del país y se presenta en el segundo lugar a nivel nacional de mortalidad en cánceres en la mujer, por lo que representa un problema de salud pública de alto impacto en México (IMSS, 2015).

En la actualidad se ha buscado desarrollar estrategias terapéuticas eficientes contra el cáncer de mama a partir de su subtipo molecular específico. Mediante el uso de herramientas moleculares se ha catalogado esta neoplasia en 4 subtipos principales siendo Luminal A y B los de mayor frecuencia, HER2/neu y finalmente el subtipo basal (BLBC) donde se incluye el cáncer de mama triple negativo (TNBC).

El cáncer de mama triple negativo

El TNCB es caracterizado por la ausencia o mínima expresión del receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y HER2. Actualmente, la incidencia del cáncer de mama triple negativo se estima que se encuentra entre el 15% y 20% de todos los casos de cáncer de mama. De interés, estudios sugieren que si se presentan receptores de estrógeno positivos (ER+) existe una recurrencia, y aproximadamente el 30% se transformará en un fenotipo más agresivo como el tipo basal (BLBC) (E a Rakha, 2007; Emad a. Rakha, Reis-Filho, & Ellis, 2008).

Los pacientes con BLBC frecuentemente son jóvenes, descendientes de afro-americanos y latinos, presentan una alta incidencia de mutaciones en el gen BRCA1 y un alto grado histológico, sufren un alto índice de metástasis a cerebro y/o a pulmón en menos de tres a cinco años de la primera aparición, y tienen pobre sobrevida (Carey et al., 2006; Dent et al., 2007; Ihemelandu et al., 2007; Smid et al., 2008). La quimioterapia estándar no es efectiva contra este subtipo, que actualmente no tiene opciones de terapia dirigida ni personalizada.

La mayoría de las pruebas clínicas han utilizado el fenotipo Triple Negativo (TNP) para la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona (PR), y del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) para definir BLBC (Bidard et al., 2007; E. Rakha, Ellis, & Reis-Filho, 2008; Emad a. Rakha et al., 2008).

El factor de transcripción Forkhead Box C1 (FOXC1) fue identificado como un biomarcador potencial para este subtipo molecular de cáncer (Jensen et al., 2015), una alta expresión se correlaciona con una pobre sobrevida en el cáncer de mama (Dejeux et al., 2010; Herschkowitz et al., 2010; Jensen et al., 2015; Ray et al., 2010).

Con la intención de perfilar este tipo de cáncer investigadores han enfocado sus esfuerzos a realizar estudios de expresión y de genotipificación, encontrándose una gran variabilidad en los datos obtenidos, posiblemente por las características heterogéneas de sus poblaciones.

En la tesis doctoral de Santuario-Facio del 2012 se realizó un estudio prospectivo en una muestra poblacional homogénea de pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) y se comparó con un grupo de pacientes no triple negativo (nTNBC).

El objetivo fue analizar el perfil de expresión de TNBC vs nTNBC en una población homogénea del noreste de México, con el fin de encontrar rutas metabólicas características del TNBC.

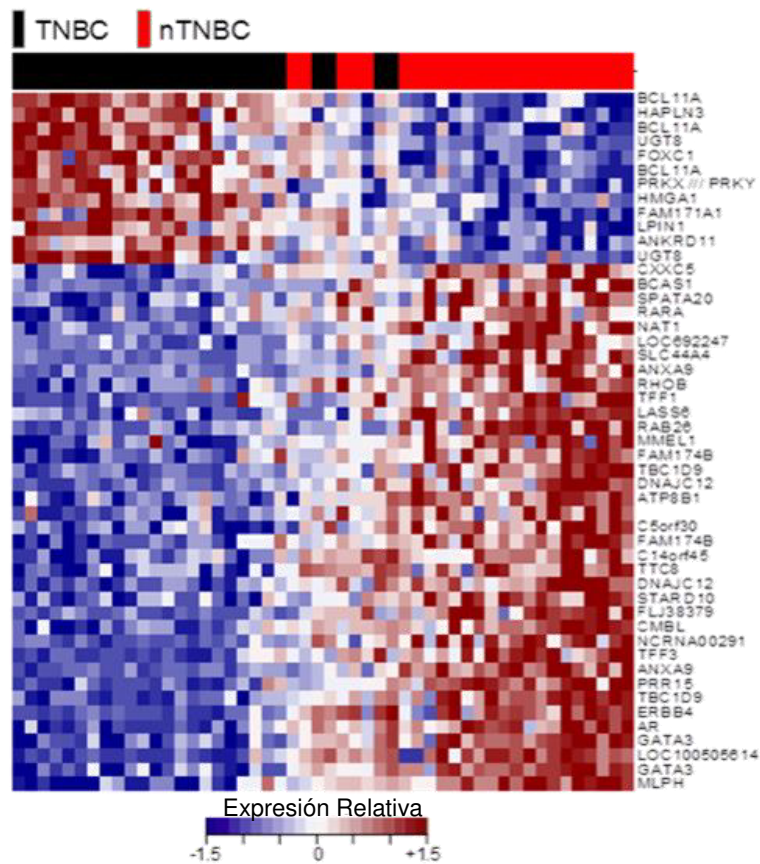


Figura 1. Mapa de calor de estudio comparativo TNBC vs nTNBC modificado de Santuario-Facio, 2012.

Utilizando la plataforma de microarreglos de expresión de Affymetrix, se identificó un perfil de expresión compuesto por 40 genes asociados al fenotipo TNBC. De los 40 genes, 9 se encontraron sobreexpresados y 31 subexpresados. De manera interesante, algunos de estos genes se han asociado previamente al cáncer de mama. HMGA1, LPIN1 y PRKX participan en el metabolismo de la insulina, UGT8 participa en el metabolismo de esfingolípidos, mientras que son factores de transcripción asociados con el crecimiento tumoral (BCL11A), metástasis y pobre pronóstico (FOXC1).

El factor de transcripción FOXC1 fue de especial interés para el grupo de investigación de Facio y colaboradores por sus características de regulación a procesos de desarrollo y transición epitelial mesenquimal (B Han et al., 2017).

Las proteínas Forkhead Box

Las proteínas Forkhead Box (Fox) constituyen una familia evolutivamente conservada de factores de transcripción con un papel central no sólo durante el desarrollo, sino también en el organismo adulto. Comparten un dominio de unión al DNA conservado de ~100 aminoácidos (Winged-helix o dominio de unión forkhead). La familia FOX está involucrada en procesos de proliferación celular, diferenciación, y muerte celular (B Han et al., 2017). Las mutaciones en genes de la familia FOX frecuentemente inducen enfermedades genéticas, promueven el cáncer o desregulan procesos como el envejecimiento. Se ha reportado que mutaciones genéticas germinales en FOX causan enfermedades que van desde la infertilidad, afecciones del lenguaje y se presentan trastornos del habla y defectos inmunológicos. Por otra parte, debido a su papel central en vías de señalización y en la regulación de la homeostasis, la desregulación somática y mutación de los genes FOX están asociados con el cáncer (B Han et al., 2017; Jensen et al., 2015; Smith et al., 2000; Tkocz et al., 2012; D. S. Wang et al., 2016).

Forkhead Box C1

Forkhead Box C1 (FOXC1) es un gen que se encuentra en el cromosoma 6 (6p25.3) y codifica para una proteína monomérica de 553 aminoácidos la cual es un factor de transcripción que se involucra principalmente en el desarrollo embrionario, ocular y morfogénesis cardíaca. FOXC1 consta de un dominio de transactivación N-terminal, el dominio de unión al ADN tipo forkhead, el dominio inhibidor de la transcripción y el dominio de transactivación C-terminal (Berry, Saleem, & Walter, 2002). El dominio de la cabeza del forkhead tiene una secuencia de consenso del sitio de unión al ADN GTAAATAAA (Pierrou, Hellqvist, Samuelsson, Enerbäck, & Carlsson, 1994). Comparado con Otros miembros de la familia FOX, FOXC1 tiene funciones críticas en condiciones fisiológicas y patológicas como se observa en la Figura 2 en embriogénesis, progresión tumoral, angiogénesis y la transición epitelial mesenquimal.

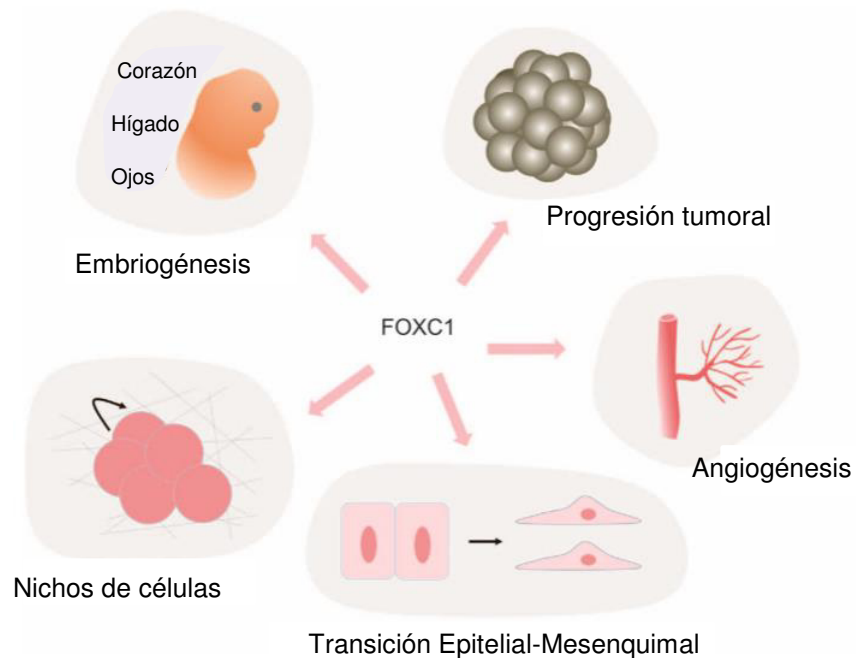


Figura 2. Diagrama de las funciones de *FOXC1* en procesos biológicos y patológicos. (Modificado de B Han et al., 2017). *FOXC1* tiene participación principalmente en el desarrollo embrionario modulando la diferenciación de corazón, hígado y ojos. En la etapa adulta del humano participa en la progresión tumoral, aumenta la angiogénesis y fomenta nichos celulares, además se ha relacionado a la Transición Epitelial-Mesenquimal.

Clásicamente, FOXC1 juega un papel importante en las diferentes etapas a lo largo del desarrollo embrionario. La acumulación de pruebas ha demostrado su papel en el desarrollo y progresión de tumores, incluyendo cáncer de mama, leucemia mieloide aguda (LMA), carcinoma hepatocelular y muchos otros subtipos de cáncer. Mutaciones en FOXC1 rara vez se ven en cáncer, sus mutaciones están implicadas con el síndrome de Axenfeld-Rieger (AR), (Mears et al., 1998; Nishimura et al., 1998; Tumer & Bach-Holm, 2009) una enfermedad autosómica dominante que afecta principalmente el desarrollo de los ojos y el hueso.

FOXC1 en el desarrollo embrionario

El ARN mensajero de FOXC1 (mRNA) se detecta en múltiples tejidos embrionarios, los patrones de expresión indican la necesidad de FOXC1 en el desarrollo embrionario temprano. De hecho, los ratones knockout FOXC1 mueren al nacer con muchos defectos incluyendo hidrocefalia, defectos oculares y múltiples anomalías esqueléticas (Kume et al., 1998).

La implicación de FOXC1 en hueso también se ha explorado. Por ejemplo, el desarrollo de hueso de calvario de ratón requiere la expresión de la proteína homeobox 4 (ALX4), de la homeobox 2 Msh (MSX2), inducida por la proteína morfogenética ósea (BMP), ambas reguladas por FOXC1 (Rice, Rice, Olsen, & Thesleff, 2003). Otro estudio mostró que FOXC1 puede unirse directamente al promotor MSX2 y regular positivamente la expresión génica para inducir la diferenciación de osteoblastos (Mirzayans, Lavy, Penner-Chea, Berry, & Takahashi, 2012). Curiosamente, FOXC1 también podría regular negativamente la expresión de MSX2 reduciendo la respuesta de MSX2 a BMP inducida por SMAD1 (Sun, Ishii, Ting, & Maxson, 2013). Así, la regulación de FOXC1 a MSX2 es dependiente de su contexto celular.

FOXC1 es también indispensable para la osificación endocondral por la interacción con el factor de transcripción GLI2 de la vía de señalización hedgehog (Yoshida et al., 2015). Un mecanismo similar también se encuentra en la regulación de células madre de tumor (CSC) que dan las propiedades de alta agresividad en BLBC (Bingchen Han et al., 2015).

La transición epitelial mesenquimal

La transición epitelial mesenquimal es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden su morfología apico-basal abandonando su fenotipo epitelial para optar por un fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal y finalmente el fenotipo mesenquimal en el cual adquieren características de alta migración e invasión, lo que se relaciona con procesos normales del cuerpo humano tales como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Sin embargo, se ha observado que este mecanismo es usado por células tumorales para fomentar metástasis a distancia (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Se puede dividir en tres fases las cuales corresponden a un fenotipo epitelial, un fenotipo intermedio como células en transición y finalmente un fenotipo mesenquimal como se observa en la figura 3.

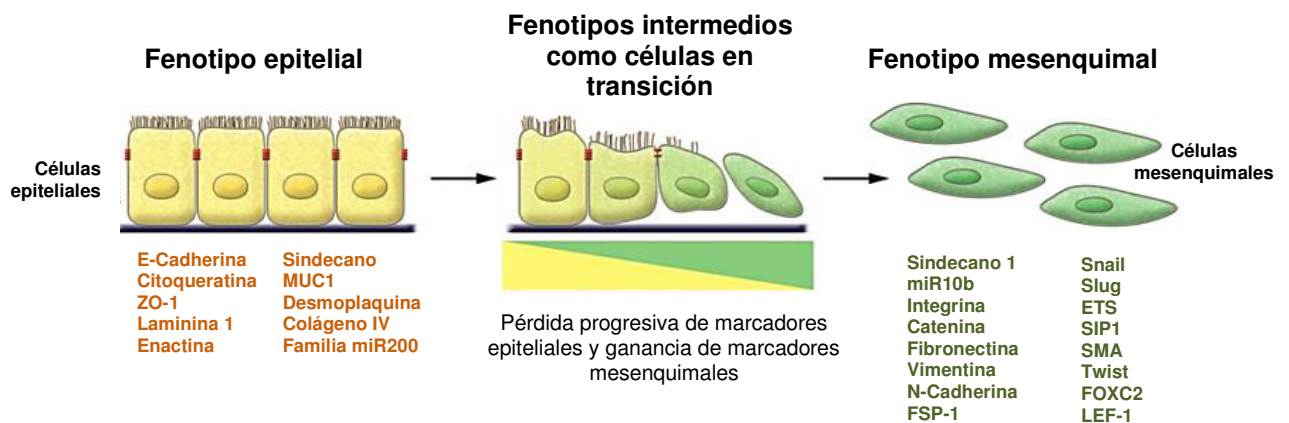


Figura 3. Fases y marcadores de la EMT. Modificado de Kalluri, 2009. En cada una de las etapas se describe un fenotipo específico con la expresión característica de marcadores epiteliales o mesenquimales, en la etapa intermedia se observa un fenotipo medio como células en transición.

Como se observa, en cada etapa se destaca la expresión de proteínas características que son consideradas marcadores, siendo así dos subconjuntos de marcadores epiteliales y mesenquimales respectivamente, que disciernen en una tendencia a determinada fase de este proceso. Al ser una transición, se espera que la expresión de estos genes se encuentre predominando en una etapa al comenzar o terminar el proceso y mantener un patrón poco definido al analizarlo en un punto medio del mismo (Kalluri & Weinberg, 2009).

EMT en la progresión del cáncer y metástasis

El proceso de metástasis requiere de invasión celular, que es permitida por la EMT. Las células presentes en un carcinoma en el tumor primario pierden la adhesión célula-célula mediada por la represión de E-cadherina y traspasan la membrana basal con características invasivas aumentadas, y entran en el torrente sanguíneo en el proceso llamado intravasación. Más tarde, cuando estas células tumorales circulantes (CTC) salen del torrente sanguíneo para formar micrometástasis, se someten a la MET (Mesenquimal-to-epitelial transition o Transición mesenquimal - epitelial) para el crecimiento clonal en estos sitios metastásicos. Por lo tanto, la EMT y MET forman el inicio y final de la cascada invasión-metástasis (Chaffer & Weinberg, 2011).

EMT confiere resistencia a la senectud prematura inducida por oncogenes. *Twist1* y *Twist2*, así como *ZEB1* protege a las células humanas y los fibroblastos embrionarios de ratón de la senescencia. (Lamouille et al., 2014)

Además, TGF β puede promover la invasión de tumores y la evasión de la vigilancia inmune en etapas avanzadas. Cuando TGF β actúa sobre las células epiteliales mamarias que expresan Ras, la EMT es favorecida y la apoptosis se inhibe (Massagué et al., 2008). Este efecto puede ser revertido por inductores de diferenciación epitelial, como GATA-3 (Chu et al., 2013).

EMT ha sido indicado para participar en la adquisición de resistencia a los medicamentos. Se encontró que la ganancia de los marcadores EMT estaba

asociada con la resistencia de las líneas celulares epiteliales de carcinoma ovárico a paclitaxel. Del mismo modo, SNAIL también confiere resistencia a paclitaxel, adriamicina y la radioterapia mediante la inhibición de la apoptosis mediada por p53 (Kajiyama et al., 2007).

Además, se ha demostrado que la inflamación, que se ha asociado con la progresión del cáncer y la fibrosis, está relacionada con el cáncer a través de la EMT inducida por la inflamación (Kalluri & Weinberg, 2009). Por lo tanto, la EMT no sólo permite a las células el fenotipo migratorio, sino que también actúa sobre la inmunosupresión múltiple, la resistencia a fármacos y la evasión de la apoptosis, mostrando así una respuesta alterada del huésped al tumor.

Algunas pruebas sugieren que las células que se someten a EMT ganan las propiedades características de las células madre, dando lugar a Células madre de tumor (CSC – Cancer stem cells). Tras la transfección por Ras activado, una subpoblación de células que presentan los marcadores de células madre putativo CD44^{high} / CD24^{low} aumenta con la inducción concomitante de EMT (Mani et al., 2008). Además, ZEB1 es capaz de conferir propiedades de células madre similares, reforzando así la relación entre EMT y las células madre de tumor. Esta propiedad conferida por la EMT es, por lo tanto, doblemente peligrosa para el paciente, ya que no sólo permite que las células de carcinoma penetren en el torrente sanguíneo, sino que además les confiere propiedades de células madre en virtud de las cuales estas células tienen potencial tumorigénico y proliferativo aumentado.

Sin embargo, estudios han desplazado aún más los efectos primarios de EMT lejos de la invasión y la metástasis, hacia la resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Kajiyama et al., 2007). La investigación de Singh y colaboradores sobre el cáncer de mama y el cáncer de páncreas no demostró ninguna diferencia en el potencial metastásico de sus células o en la adquisición de la EMT (Singh & Settleman, 2010). En el estudio de Shamir y colaboradores se demuestra que el factor de transcripción TWIST requiere conservar intactas las uniones adherentes con el fin de mediar la invasión local en el cáncer de

mama (Shamir et al., 2014). Los efectos de la EMT y su relación con la invasión y la metástasis pueden ser altamente específicos, así como dependientes del contexto celular (Kalluri & Weinberg, 2009). Uno de los genes más importantes para la fase epitelial de las células es la expresión de E-Cadherina (CDH1), siendo la principal proteína encargada de las uniones célula-célula.

CDH1

CDH1 conocido comúnmente como E-Cadherina es un miembro clásico de la superfamilia cadherina. La proteína codificada es una glicoproteína de adhesión de célula-célula dependiente de calcio compuesta por cinco repeticiones de cadherina extracelular, una región transmembrana y un extremo citoplasmático altamente conservado (Shamir et al., 2014).

Las transiciones entre los estados epitelial y mesenquimal desempeñan un papel importante en el desarrollo embrionario y la metástasis del cáncer. Cambios en el nivel de E-cadherina en la EMT y MET definen la etapa o fase en la que se encuentra la célula dependiendo de este nivel de expresión. E-cadherina actúa como un supresor de invasión y un gen clásico supresor de tumores en el carcinoma lobular pre-invasivo de mama (Polyak & Weinberg, 2009).

E-cadherina en EMT:

La E-cadherina es un tipo crucial de adhesión de célula-célula para mantener las células epiteliales apretadas juntas. E-cadherina puede secuestrar β -catenina en la membrana celular por la cola citoplasmática de E-cadherina. La pérdida de la expresión de E-cadherina da como resultado la liberación de β -catenina en el citoplasma. Las moléculas de β -catenina liberadas pueden migrar al núcleo y desencadenar la expresión de factores de transcripción inductores de EMT. Junto con otros mecanismos, como la activación constitutiva de RTK, la pérdida de E-cadherina puede conducir a las células cancerosas al estado mesenquimal y

sufrir metástasis. E-cadherina es un importante interruptor en EMT (Polyak & Weinberg, 2009).

E-cadherina en MET:

Las células cancerosas del estado mesenquimal migran a nuevos sitios y pueden sufrir MET en cierto microambiente favorable. Por ejemplo, las células cancerosas pueden reconocer características diferenciadas de células epiteliales en los nuevos sitios y regular positivamente la expresión de E-cadherina. Esas células cancerosas pueden formar adherencias célula-célula de nuevo y volver a un estado epitelial (Polyak & Weinberg, 2009).

Antecedentes directos

FOXC1 y el cáncer de mama triple negativo

Empleando un análisis transcriptómico, se reportó que la sobreexpresión de FOXC1 es un biomarcador a nivel de tejido y es superior a los marcadores establecidos en paneles como el TNP (Ray et al., 2011). Previamente, se reportó que existe una sobreexpresión consistente de mRNA de FOXC1 en el BLBC (Ray et al., 2010). La elevada expresión de mRNA de FOXC1 fue asociada con un pronóstico pobre de supervivencia, independiente de otras variables clinicopatológicas. Consistentemente con la propensión ya conocida de los BLBCs a desarrollar metástasis de cerebro, niveles altos de mRNA de FOXC1 se correlacionan significativamente con una menor supervivencia libre de metástasis en pacientes con nódulos linfáticos negativos. Además, la sobreexpresión ectópica de FOXC1 en células de cáncer de mama induce fenotipos agresivos, los cuales han sido explicados por un mecanismo tal como la transición epitelio-mesénquimal e incrementa la proliferación celular, migración e invasión (Ray et al., 2011).

Posteriormente, se reporta que la sobreexpresión de la proteína FOXC1 también podría ser una característica del BLBC. Se demostró empleando análisis de microarreglos e inmunoblotting que los niveles de expresión de FOXC1 a nivel de mRNA y proteína son específicos para el cáncer de mama de subtipo basal en tejido y/o líneas celulares (Bernard et al., 2009; Curtis, Shah, Chin, & Turashvili, 2012).

Se ha demostrado que FOXC1 es de importancia al orquestar la agresividad biológica y metastásica potencial del BLBC (Bingchen Han et al., 2015) (Yu et al., 2013). Actualmente, no se ha elucidado el mecanismo exacto por el cual los tumores BLBC son tan agresivos y proliferan tan rápido. Sin embargo, se han identificado algunos marcadores que incluyen a la metaloproteasa de matriz 7 (MMP7) como un efector de invasividad río abajo del mediador FOXC1. Estos

marcadores correlacionan significativamente en muestras de cáncer de mama y líneas celulares. El posible papel de la MMP7 en la promoción a metástasis tiene su base en la función propia de la proteína (Sizemore & Keri, 2012), ya que participan en la ruptura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos, así como en enfermedades, como la artritis y progresión a metástasis. La mayor parte de las MMP se secretan como pro-proteínas inactivas que se activan cuando se escinden por proteasas extracelulares. Sin embargo, en su conjunto estas metaloproteasas son características del proceso de transición epitelial-mesenquimal.

FOXC1 y la transición epitelial mesenquimal

La transición epitelial mesenquimal es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden su morfología apico-basal abandonando su fenotipo epitelial para optar por un fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal y, finalmente, el fenotipo mesenquimal en el cual adquieren características de alta migración e invasión, lo que se relaciona con procesos normales del cuerpo humano tales como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Sin embargo, se ha observado que este mecanismo es usado por células tumorales para fomentar metástasis a distancia. FOXC1 ha sido relacionado a este proceso en cáncer de endometrio, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de lengua, adenocarcinoma pituitario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, melanoma y carcinoma hepatocelular (Rhodes et al., n.d.; Taube et al., 2010)(Lin et al., 2014; Liu, Han, Bai, Du, & Yang, 2017; D. S. Wang et al., 2016; Jinhua Wang et al., 2016). Sin embargo, esta relación no ha sido estudiada en cáncer de mama.

Justificación

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres siendo su primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Consiste en una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Se estima que en 2012 murieron 324,000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo reporta la Globocan en el 2004. Según datos de INEGI de 2014 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, concentrando su morbilidad en el norte del país.

Mediante el uso de herramientas moleculares se ha catalogado esta neoplasia en 4 subtipos principales siendo Luminal A y B los de mayor frecuencia, HER2/neu y finalmente el subtipo basal (BLBC) donde se incluye el cáncer de mama triple negativo (TNBC).

El TNBC es caracterizado por la ausencia o mínima expresión del receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y HER2. Actualmente, la incidencia del cáncer de mama triple negativo se estima se encuentra entre el 15% y 20% de todos los casos de cáncer de mama y estudios recientes sugieren que si se presentan receptores de estrógeno positivos (ER+) existe una recurrencia, y aproximadamente el 30% se transformará en un fenotipo más agresivo como el tipo basal.

La quimioterapia estándar no es efectiva contra este subtipo, que actualmente no tiene opciones de terapia dirigida ni personalizada. Los tumores en el cáncer de mama triple negativo presentan una mayor agresividad, migración e invasión celular.

La transición epitelial mesenquimal es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden su morfología apico-basal abandonando su fenotipo epitelial para optar por un fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal y finalmente el fenotipo mesenquimal en el cual adquieren características de alta migración e invasión, lo que se relaciona con procesos normales del cuerpo humano tales como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Sin embargo, se ha observado que este mecanismo es usado por células tumorales para fomentar metástasis a distancia. FOXC1 ha sido relacionado a este proceso en cáncer de endometrio, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de lengua, adenocarcinoma pituitario y carcinoma hepatocelular.

Se ha reportado que la sobreexpresión del factor de transcripción FOXC1 es un biomarcador para el cáncer de mama triple negativo y su relación con la progresión a la transición epitelial mesenquimal (EMT) pero no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales esto se lleva a cabo.

Es por esto por lo que se necesita elucidar si FOXC1 es un efector primario en la progresión a la transición epitelial mesenquimal en líneas celulares de cáncer de mama.

Pregunta de investigación

¿El factor de transcripción FOXC1 promueve la transición epitelial mesenquimal en líneas celulares de cáncer de mama y da las características de alta invasión?

Hipótesis de trabajo

El factor de transcripción FOXC1 activa la transcripción de genes que promueven la transición epitelial mesenquimal en líneas celulares de cáncer de mama y esto aumenta la invasión celular.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el papel del factor de transcripción FOXC1 en la regulación de genes relacionados a la EMT en un modelo *in vitro* de cáncer de mama.

Objetivos específicos

1. Realizar el silenciamiento de FOXC1 en la línea MDAMB231 y determinar sus niveles de expresión relativa.
2. Realizar la sobreexpresión de FOXC1 en la línea HCC1395 y determinar sus niveles de expresión relativa.
3. Obtener la expresión relativa de los marcadores de la EMT en las líneas celulares MDAMB231 y HCC1395.
4. Determinar si la expresión de FOXC1 afecta la invasión celular en un modelo *in vitro*.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para este proyecto se utilizaron 2 líneas celulares de cáncer de mama (ver tabla 1) las cuales se obtuvieron de la casa comercial ATCC y se mantuvieron en medio DMEM o RPMI con SBF al 10% y 5% CO₂, de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas y su clasificación basada en el subtipo de cáncer de mama.

Línea Celular	Subtipo de cáncer de mama
HCC1395	Triple negativo Primario
MDAMB231	Triple negativo Metastásico

Materiales y reactivos

Agarosa

Buffer RDD

Agente transfectante Xfect
(Clontech)

Buffer TE 1x

Canaleta

Agua tratada con DEPC

Cloroformo

Alcohol absoluto

DEPC

Alcohol etílico 70%

DNasa

Alcohol etílico 80%

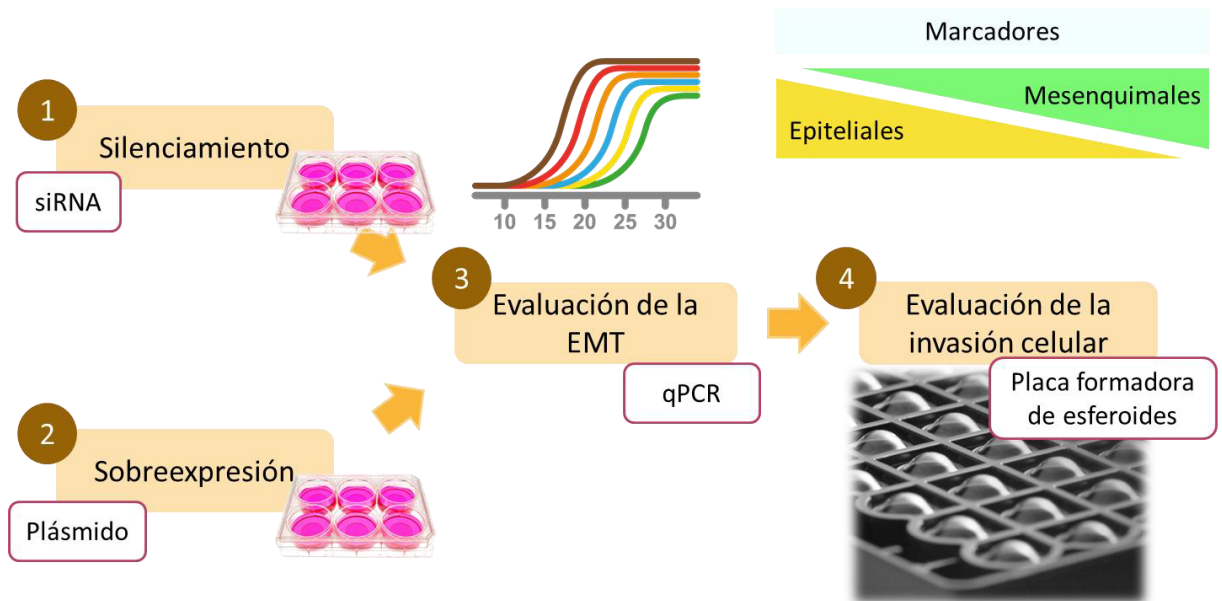
EGF (20 ng/ml)

Gradilla 96 tubos .2 ml	Pipeta multicanal 300 ul
Gradilla 96 tubos 2 ml	Placa de cultivo celular 6 pozo
Hielo	Placa de cultivo celular 96 pozos
Master Mix Universal (Applied Biosystems)	Placa de ultrabaja adherencia de 96 pozos
Matrigel	Plásmido CMV-FOXC1 (Origene)
Medio DMEM	Puntillas para micropipeta
Medio OptiMEM	Sanitas
Micropipeta 100 ul	Sondas de hidrólisis IDT (VIM, FN1, SNAI1, SNAI2, CDH1, CDH2, MMP7, TJP1, GAPDH)
Micropipeta 1000ul	Sondas Taq Man (FOXC1, GAPDH)
Micropipeta 20 ul	Tubo de 15 ml
Micropipeta 200 ul	Tubo de 50 ml
Micropipetas 1ul	Tubos .7 ml
Pipeta 10 ml	Tubos 1.7 ml
Pipeta 10 ml y 5 ml	Tubos de 2 ml
Pipeta 5 ml	

Equipos utilizados

Cámara de electroforesis BioRad	Campana de flujo laminar BSL2
Termociclador Perkin Elmer 2000	Transiluminador QuemiDoc
Light Cyclor 480 Roché	Microscopio de campo claro Zeuss
Incubadora de CO ₂	Microcentrífuga Eppendorff

Estrategia general:



Ensayo de silenciamiento de FOXC1

Para este ensayo se utilizó la línea celular MDAMB231 (cáncer de mama triple negativo metastásico) la cual presenta una sobreexpresión de FOXC1. Mediante RNA de interferencia se silenció su expresión utilizando el kit Silencer siRNA Transfection II de Thermo Fisher Scientific. Pevio a realizar el ensayo final se evaluaron las condiciones óptimas para su uso estandarizando el número de células a emplear en un rango de 5,000 a 40,000 células. El agente transfectante fue Neo FX o Amine FX. y finalmente el tiempo donde se observó una mayor inhibición de la expresión de este gen a las 24, 48 o 72 horas.

Para evaluar la inhibición selectiva de la transcripción se incluyó un control negativo proporcionado por el kit, el cual representa una secuencia no homóloga a la región del genoma humano, denominada como Scramble. El control positivo fue el gen endógeno GAPDH, además, se incluyeron controles tales como el ensayo completo sin agente transfectante y sin RNA de silenciamiento para evaluar la toxicidad de los mismos y determinar si afectan la expresión del gen estudiado (FOXC1).

Posteriormente, se procedió a la extracción y purificación del RNA para determinar los niveles de expresión de FOXC1 y los 8 marcadores de la transición epitelial mesenquimal seleccionados.

Ensayo de sobreexpresión de FOXC1

Se utilizó el vector de expresión RG215629 de OriGene el cual contiene el sitio ORF de la proteína FOXC1, además de un promotor de citomegalovirus y como antibiótico de selección neomicina en la línea celular HCC1395 (cáncer de mama triple negativo primario) la cual no sobreexpresa FOXC1 en condiciones normales.

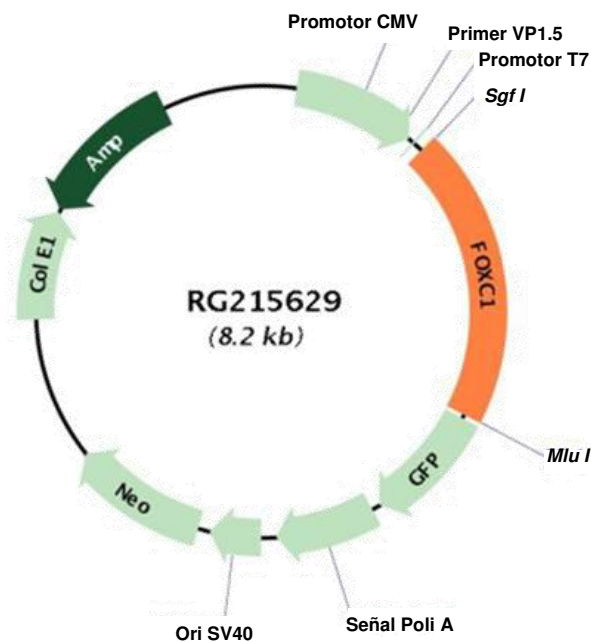


Figura 4. Mapa del vector RG215629 con sitio ORF de FOXC1 de la casa comercial OriGene. Caracterizado por tener dos antibióticos de selección que son Ampicilina y Neomicina, expresa GFP como marcador de transfección y promotor de CMV para asegurar expresión constante de la proteína.

Se estandarizaron las condiciones del ensayo donde se evaluaron aspectos como la concentración de plásmido y de agente transfectante Xfect Single Shots (Midi) (Cat 631366 de Clontech) necesarias para llevar a cabo la

sobreexpresión del gen de interés, además de la cantidad de células necesarias fue de 110,000 células en una placa de 6 pozos y finalmente, el tiempo donde se observó una mayor sobreexpresión de FOXC1.

Posteriormente, se procedió a la extracción y purificación del RNA para determinar los niveles de expresión de FOXC1 y los 8 marcadores de la transición epitelial mesenquimal seleccionados.

Extracción de RNA de líneas celulares con Purezol

Se realizó la extracción de RNA de las 2 diferentes líneas celulares como se observa en la tabla 1, En breve, se añadió 1 ml de Purezol por cada 25 cm² de cultivo, se pipeteó arriba y abajo repetidas veces. Después de incubar el lisado durante 5 min a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de cloroformo, cubrió y agitó vigorosamente durante 15 s sin dar vortex. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y agitó periódicamente la muestra. Se centrifugó a 12,000 g x 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación la mezcla se separó en 3 fases: superior, incolora fase acuosa, una interfase blanca, y una fase orgánica inferior. Sin perturbar la interfase, inmediatamente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo libre de RNasas y se añadieron 500 µl de alcohol isopropílico. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Después de centrifugar a 12,000 g x 10 min a 4°C, el RNA aparece como un pellet blanco en el fondo del tubo. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante. Para lavar el pellet, se añadió 1 ml de etanol al 75% y se mezcló mediante agitación a la muestra, posteriormente se centrifugó a 7,500 g x 5 min a 4°C. Cuidadosamente, se descartó el sobrenadante. Después de dejar secar el pellet de RNA durante 5 min se resuspendió el pellet en 40 µl de agua tratada con DEPC. Se cuantificó la concentración de RNA empleando el equipo Nanodrop 8000.

Purificación de RNA por columna RNeasy Mini Elute Kit de QIAGEN

Se siguió el protocolo de acuerdo a lo establecido por la casa comercial. Después de la extracción de RNA total, este se colocó en un tubo de microcentrífuga 87.5 µl de RNA, 10 µl del Buffer RDD y 2.5 µl de la solución stock de DNasa I para un volumen final de 100 µl (Mix de incubación de DNasa I). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló y añadió directamente a la membrana de la columna 100 µl del mix de incubación de DNasa I y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Al añadir 350 µl del Buffer RW1 a la columna se cerró la tapa y centrifugó a 10,000 rpm x 15 s a 25°C para descartar el flujo. Utilizando el mismo tubo de colección del paso anterior se añadieron 500 µl del Buffer RPE se cerró la tapa y centrifugó a 10,000 rpm x 15 s a temperatura ambiente para lavar la membrana y se descartar el flujo que pasa por la columna. Utilizando el mismo tubo de colección del paso anterior se añadieron 500 µl del Buffer RPE. Se cerró la tapa y centrifugó a 10,000 rpm x 15 s a temperatura ambiente para lavar la membrana.

En un nuevo tubo de colección de 2 ml después de colocar la columna, se centrifugó a 13,500 rpm x 1 min. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección de 1.5 ml. Se añadieron 40 µl de agua tratada con DEPC directo en la membrana de la columna. Para eluir el RNA se centrifugó a 10,000 rpm x 1 min a a 25°C. Se repitió el procedimiento anterior usando la elución obtenida para concentrar la mayor cantidad posible de RNA.

En un nuevo tubo de colección de 1.5 ml se añadieron 20 µl de agua tratada con DEPC directo en la membrana de la columna para eluir el RNA y se centrifugó a 10,000 rpm x 1 min a 25°C. Se cuantificó en Nanodrop 8000 y se verificó la integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 85 V durante 1 hora. Se realizó la cuantificación de RNA mediante Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent en el equipo Qubit®, para esto se realizó una curva de calibración estándar.

Obtención de cDNA por retrotranscripción

Para la obtención de cDNA se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Thermo Fisher Scientific Inc. Inicialmente se preparó la mezcla de reacción (master mix) que consiste en lo siguiente (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes de reacción de retrotranscripción en un volumen final de 20 μ l.

Reactivo	1x
Buffer RT 10x	2 μ l
dNTPs 25x	0.8 μ l
Oligo dT 10x	1 μ l
Transcriptasa Reversa MiltiScribe	1 μ l
Inhibidor de RNasa	1 μ l
400 ng RNA	14.2 μ l
Volumen total de reacción	20μl

Se tomaron 5.8 μ l del master mix de retrotranscripción y se colocaron 400 ng de RNA totales previamente cuantificado por RiboGreen suspendidos en 14.2 μ l de volumen total.

Las condiciones usadas se describen en la tabla 3 se utilizó un Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para retrotranscripción.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	25°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	10 min

Obtención de la eficiencia y estabilidad de gen endógeno para ensayo de expresión de marcadores de transición epitelial-mesenquimal

A partir de la mezcla de cDNA obtenido, se realizaron diluciones seriadas en órdenes de magnitud 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, en un volumen total de 20 µl. En total se utilizaron 9 sondas de hidrólisis marcadas con FAM, para los genes: FOXC1, GAPDH, (TaqMan™ Probes, Thermo Fisher Scientific Inc, PN:4351370) y TJP1, CDH1, CDH2, ZO1, VIM, FN, MMP7 (Integrated DNA Technologies, Inc, Ref:130271169). Utilizando las proporciones descritas en la tabla 4 se realizaron triplicados en placas de 96 pozos con un volumen final de reacción de 10 µl utilizando el Light Cycler 480 de Roche. Las condiciones del ensayo se describen en la tabla 5.

Tabla 4. Componentes de la reacción de qPCR en un volumen final de 10 µl

qPCR Mix	1x
Master Mix 5x	5 µl
Sonda de hidrólisis 20 x	0.5 µl
cDNA	1 µl
Agua	3.5 µl
Volumen final de la reacción	
	10 µl

Tabla 5. Condiciones del ensayo de qPCR.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95°C	10 min
Desnaturalización		95°C	15 s
Alineamiento elongación y	50	60°C	1 min
Enfriamiento	1	40°C	10 min

Eficiencia de la reacción

Para determinar la eficiencia de la reacción se graficó el logaritmo de la concentración de cDNA y el Ct de los triplicados de cada gen por separado para obtener la pendiente de la recta y mediante la *fórmula 1* se calculó la eficiencia de la reacción por cada gen evaluado siendo 1 el valor ideal y el rango aceptado de 0.90 a 1.10.

$$\text{Fórmula 1. } E = (\text{índice del logaritmo})^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} = 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)}$$

Estabilidad del gen endógeno

Se evaluó la estabilidad de GAPDH como gen candidato para ser utilizado como gen endógeno o control en el ensayo de expresión. Para determinar la estabilidad se graficó la diferencia de los Ct (ΔCt) de FOXC1 y cada gen por separado contra el logaritmo de la concentración de cDNA utilizada. Al obtener la ecuación de la recta se evaluó la pendiente de la misma y se consideró estable si la pendiente era igual o menor a 0.2 ($m \leq 0.2$).

Ensayo de expresión relativa de FOXC1 mediante qPCR.

Para evaluar la expresión relativa de los marcadores de la transición epitelial mesenquimal en las 2 líneas de cáncer de mama (MDAMB231 y HCC1395) se utilizó como endógeno GAPDH y se determinaron los niveles de expresión mediante la *fórmula 2*, se realizaron triplicados para cada muestra.

$$\text{Fórmula 2. } \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra problema (Gen problema - Gen endógeno)} - \Delta\text{Ct muestra normalizadora (Gen problema - Gen endógeno)}$$

Ensayo invasión celular en tercera dimensión

Para determinar si la sobreexpresión e inhibición de la expresión de FOXC1 respectivamente afecta la invasión celular se realizaron ensayos de cultivo celular en tercera dimensión en los cuales se utilizaron placas formadoras de esferoides de ultra baja adherencia y Matrigel para evaluar la invasión.

Se estandarizó el número de células necesarias para llevar a cabo el ensayo, así como la concentración de Matrigel y el tiempo necesario para determinar la invasión y migración celular. Además, se evaluó si las líneas eran capaces de formar el esferoide y mostrar una capacidad invasiva utilizando un quimioatrayente (EGF 20 ul/ml) para determinar si era línea invasiva inducible, no inducible o no invasiva.

Se tomaron como condiciones de partida las mismas para cada ensayo de silenciamiento y sobreexpresión de las dos líneas respectivamente.

Resultados

Ensayo de silenciamiento de FOXC1

Los resultados de la extracción de RNA del ensayo de silenciamiento se describen en la tabla a continuación.

Tabla 6. Concentración de RNA de ensayo de silenciamiento cuantificado por NanoDrop y RiboGreen®.

Tiempo	RNA	NanoDrop		RiboGreen®
		[ng/mL]	Abs. 260/280	[ng/mL]
24h	siRNA Scramble	919.50	1.83	562.85
	siRNA GAPDH	638.10	1.81	342.37
	siRNA FOXC1	825.60	2.02	624.85
	Células solas	740.10	1.94	469.38
48h	siRNA Scramble	609.30	1.89	341.64
	siRNA GAPDH	599.70	2.11	376.80
	siRNA FOXC1	381.00	2.11	270.82
	Células solas	647.10	2.16	454.02
72h	siRNA Scramble	335.10	2.28	215.66
	siRNA GAPDH	353.40	2.30	159.55
	siRNA FOXC1	313.50	1.81	114.75
	Células solas	919.50	2.14	562.85

Los resultados de la expresión relativa de FOXC1 en la línea MDAMB 231 (TNBC) con el silenciamiento evaluado a 24h, 48h y 72 h son los que se describen en la figura 1, se observa que la muestra sin tratamiento se tomó como referencia de expresión al ser el 100% de la misma, a las 24 horas el

porcentaje de silenciamiento fue del 29%, a las 48 horas del 55% y el mayor porcentaje de silenciamiento se observó a las 72 horas con 65%. En la figura 2 se describen los resultados del ensayo final en placa de 6 pozos donde se observó un silenciamiento del 65.42% lo cual corresponde a los resultados obtenidos en el primer ensayo de estandarización.

Expresión de FOXC1 después del silenciamiento

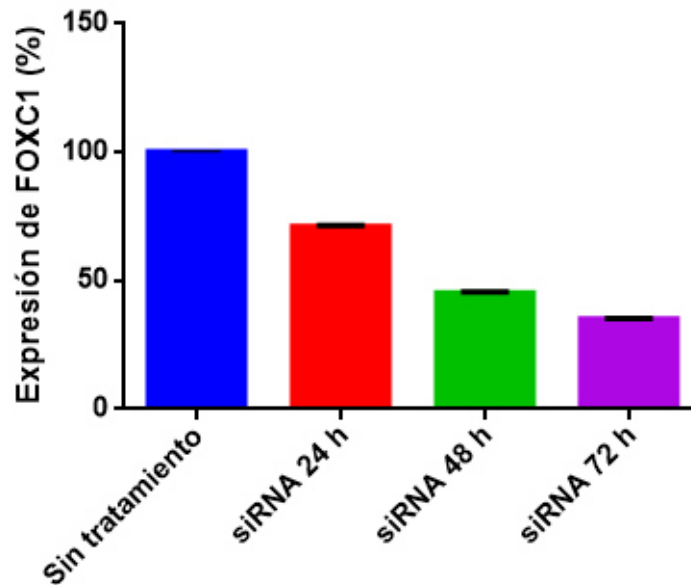


Figura 5. Resultados expresión relativa FOXC1 después del silenciamiento 24, 48, y 72 horas. La muestra sin tratamiento se tomó como referencia de expresión al ser el 100% de la misma, a las 24 horas el porcentaje de silenciamiento fue del 29%, a las 48 horas del 55% y el mayor porcentaje de silenciamiento se observó a las 72 horas con 65%.

Expresión de FOXC1 después del silenciamiento

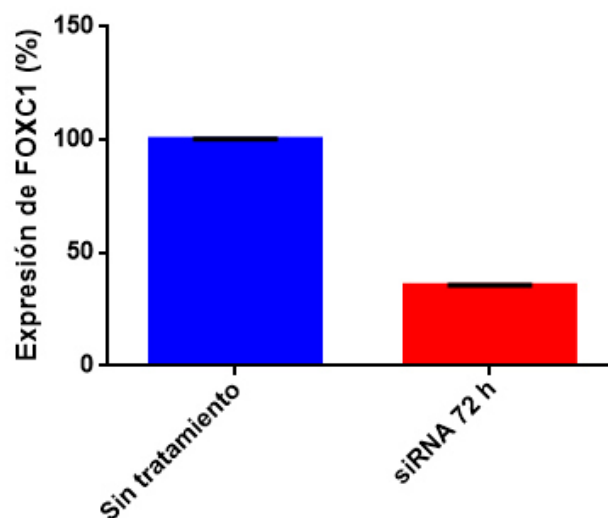


Figura 6. Expresión relativa de FOXC1 después del silenciamiento ensayo placa de 6 pozos a las 48h. El ensayo final en placa de seis pozos se evaluaron las mismas condiciones de silenciamiento con 110,000 células. Se obtuvo un silenciamiento del 65.42% lo cual es similar al obtenido previamente.

Ensayo de sobreexpresión de FOXC1

A continuación, se presenta los rendimientos de la extracción de RNA del ensayo de sobreexpresión en la línea HCC1395 (TNBC primaria).

Tabla 7. Concentración de RNA de ensayo de sobreexpresión. Se describen los valores calculados a partir de la absorbancia obtenida en NanoDrop y de las unidades de fluorescencia por RiboGreen.

48h	NanoDrop		RiboGreen®
RNA	[ng/mL]	A 260/280	[ng/mL]
siRNA FOXC1	3107.73	2.02	3107.70
Células control	3556.96	2.06	3557.10
siRNA Scramble	2608.02	2.02	2607.90
siRNA GAPDH	2753.74	2.01	2753.70

Los resultados de la expresión relativa de FOXC1 después de la sobreexpresión se presentan en la figura 7.

Sobreexpresión de FOXC1 en línea celular HCC1395

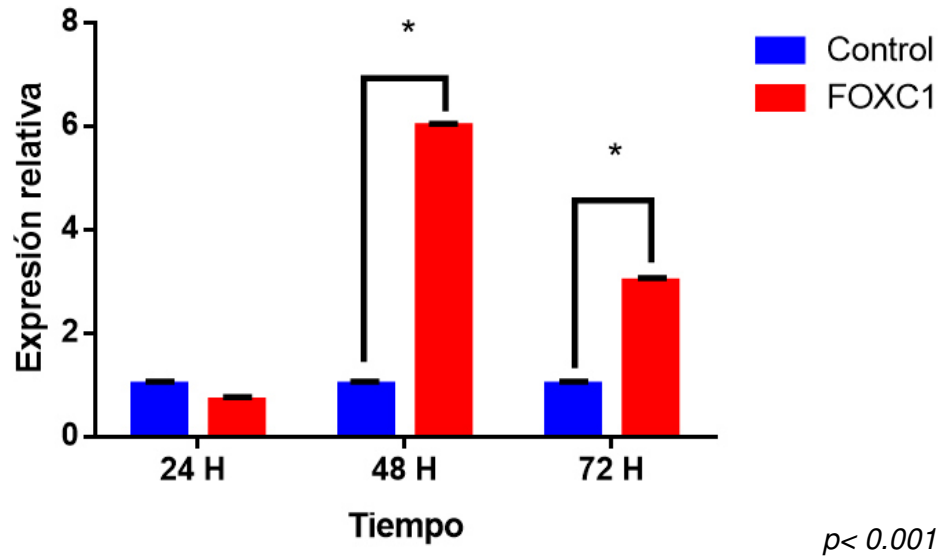


Figura 7. Expresión relativa de FOXC1 después de la sobreexpresión. A las 24 horas no se observa diferencia significativa en la expresión relativa de FOXC1 en el control y en la muestra con sobreexpresión. A las 48 horas se observó una expresión seis veces mayor que el control y finalmente a las 72 horas se observó un aumento de tres veces más expresión relativa.

La expresión relativa se evaluó durante 24, 48 y 72 horas el control de este ensayo fue la línea HCC1395 sin transfectar tomando su expresión como valor de 1. A las 24 horas no hubo diferencia significativa en la expresión, a las 48 horas se observó una sobreexpresión de 6 veces más en la línea transfectada con el plásmido y este efecto decayó a las 72 horas obteniendo 3 veces más expresión.

El tiempo donde se observó la mayor sobreexpresión de FOXC1 fue a las 48h es por esto que los marcadores EMT se evaluaron a este punto.

Obtención de la eficiencia y estabilidad de gen endógeno para ensayo de expresión de marcadores EMT

Eficiencia de la reacción

Las eficiencias obtenidas se encontraron en el rango de **0.89 a 1.19**.

El rango de eficiencia adecuado es de 0.85 a 1.20.

Estabilidad del gen endógeno

La estabilidad obtenida al contrastar cada gen con el endógeno GAPDH se encontró en un rango de **$m = 0.02$ a 0.09** .

La estabilidad de un gen problema comparado con el endógeno debe tener una pendiente de $m < 0.1$.

Expresión de los marcadores EMT en las líneas con sobreexpresión y silenciamiento.

Silenciamiento de FOXC1

La expresión relativa de los marcadores EMT en la línea MDAMB231 con silenciamiento de FOXC1 se describen en la figura 8. Se detallan los genes que representan el fenotipo epitelial siendo estos TJP1 y CDH1, además de los que presentan el fenotipo mesenquimal como lo son VIM, MMP7, CDH2, SNAI1, SNAI2 y FN1.

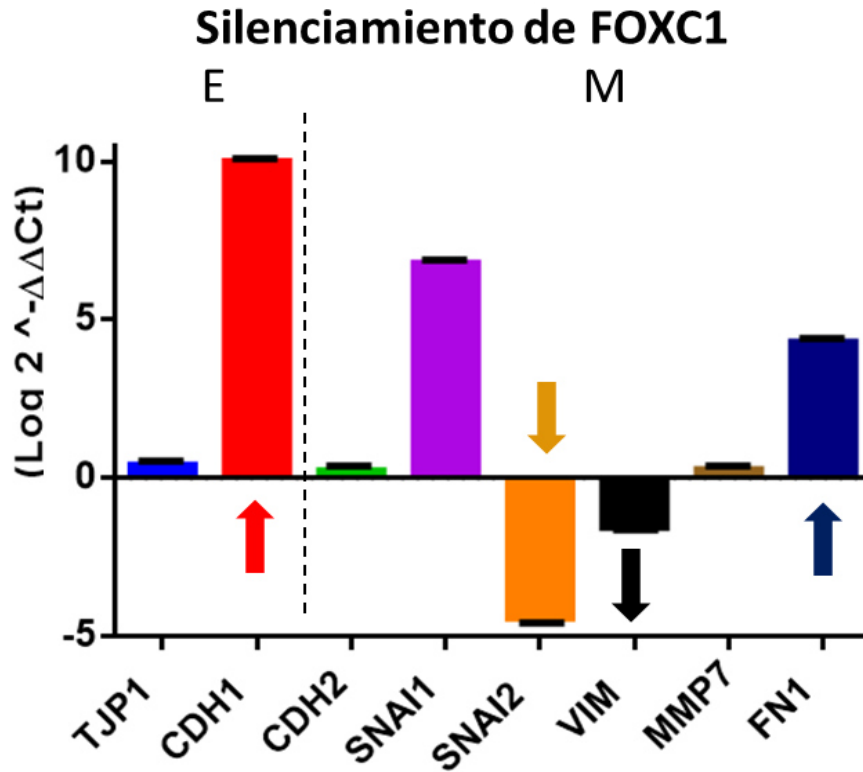


Figura 8. Expresión EMT en MDAMB231 con silenciamiento de FOXC1. Se observa la expresión relativa de dos marcadores epiteliales los cuales son TJP1 donde no hay una diferencia significativa y CDH1 donde hay un aumento significativo en la expresión. Los marcadores mesenquimales SNA1, SNAI2, VIM y FN1 se afectaron diferencialmente con el control, no se observó cambio significativo en CDH2 y MMP7.

En el ensayo de silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDAMB231 de TNBC metastásico Se observó un aumento en los marcadores CDH1, SNAI1, y FN1. Los marcadores que mostraron una subexpresión fueron SNAI2 y VIM. TJP1, CDH2 y MMP7 no tuvieron una expresión diferencial después del silenciamiento de FOXC1 a las 48 horas.

Se presentó un aumento significativo en la expresión de E-Cadherina lo que nos indica una clara inclinación a la etapa de células epiteliales las cuales no presentan esta expresión en su estado normal como células metastásicas o en este caso células mesenquimales.

Sobreexpresión de FOXC1

La expresión relativa de los marcadores EMT en la línea HCC1395 con sobreexpresión de FOXC1 se describen en la figura 9.

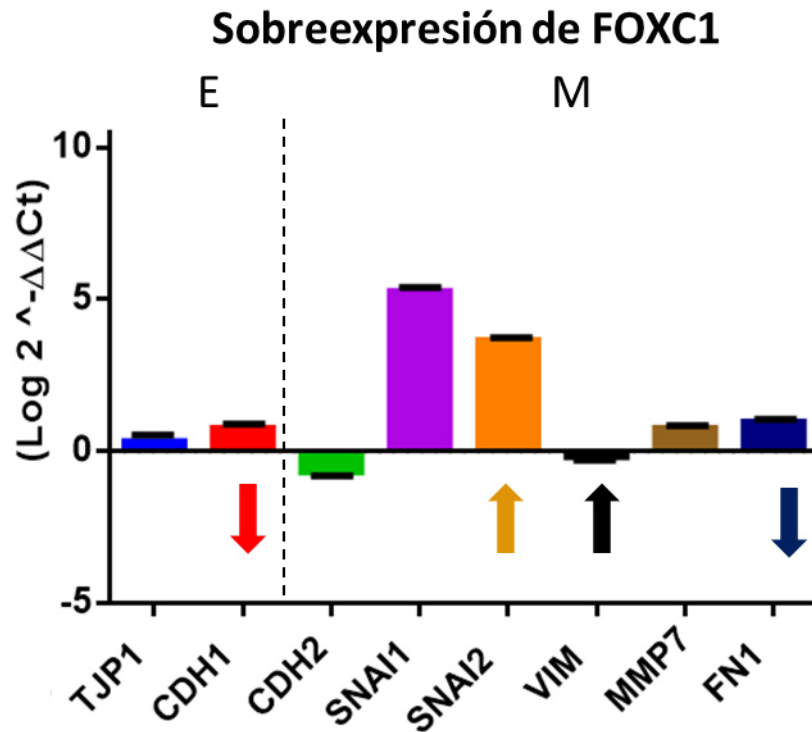


Figura 9. Expresión EMT en HCC1395 con sobreexpresión de FOXC1. Los marcadores epiteliales no se vieron afectados en la sobreexpresión respecto al control, al comparar CDH1 con los resultados del silenciamiento se observa una marcada disminución de la expresión, aumentó la expresión de SNAI2, VIM que son marcadores mesenquimales. CDH2 y MMP7 no presentaron diferencias significativas.

En la figura 9 se observa que la expresión de CDH1 disminuyó al compararla a la expresión después del silenciamiento de FOXC1, esta disminución indica una tendencia a abandonar las características de tejido epitelial y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales indican un fenotipo como células mesenquimales con la sobreexpresión de SNAI1, SNAI2 y FN1. La expresión relativa de MMP7, TJP1 y CDH2 no se afectó significativamente después de la sobreexpresión de FOXC1.

Ensayo de invasión celular en tercera dimensión

Para la evaluación de la formación de esferoide e invasión, se estimuló a las líneas HCC1395 y MDAMB231 con EFG (20 ug/ml), empleando 50,000 células en una placa de ultrabaja adherencia (Corning) de 96 pozos.

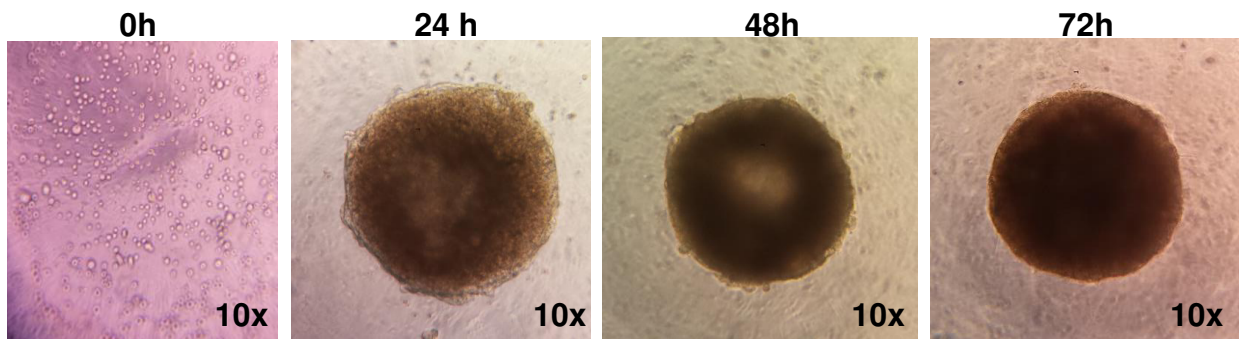


Figura 10. Evaluación de la formación del esferoide e invasión línea HCC1395. La evaluación del proceso de compactación es un parámetro que se observa acentuado a las 48 horas y continua a las 72 horas, lo cual es de esperarse en la línea HCC1395 al ser de cáncer de mama triple negativo primario. No se observan invadopodios ni células en la periferia.

En el ensayo que se describe en la figura 10 observamos que la línea HCC1395 no tiene la capacidad de invasión, al evaluarse su exposición al quimioatrayente no se presentan cambios en la periferia del esferoide, no hay presencia de invadopodios ni células en la circunferencia por lo que esta línea celular se considera no invasiva.

Para determinar si la expresión de FOXC1 afecta la invasión se determinó en el ensayo final evaluar la sobreexpresión de FOXC1 en 3 tiempos diferentes. Como se observa en la figura 11 con la línea HCC1395 con sobreexpresión de FOXC1 y la línea control sin transfección.

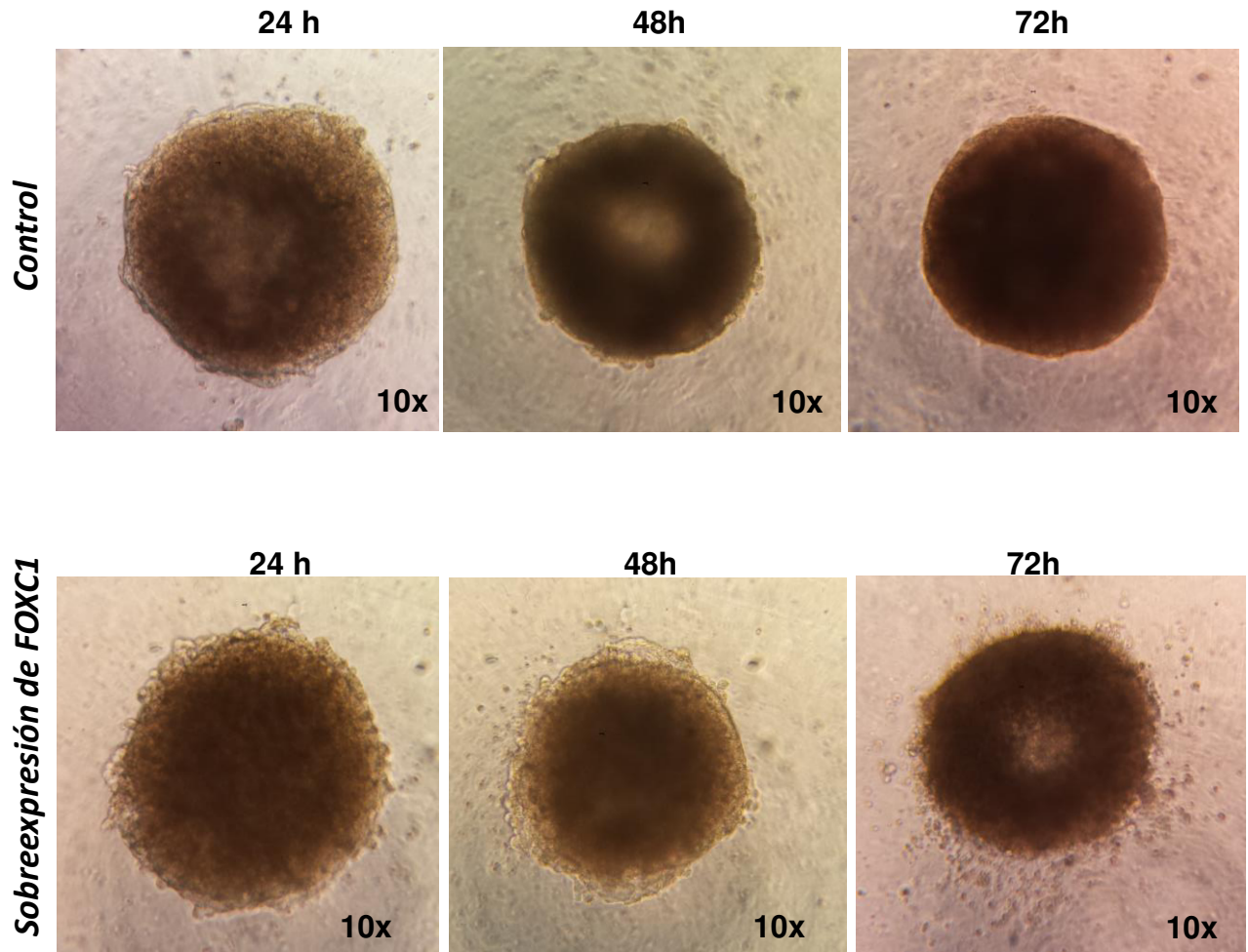


Figura 11. Evaluación de la invasión celular con la sobreexpresión de FOXC1. El ensayo de invasión no muestra diferencia significativa a las 24 horas, solo se observa el proceso de compactación y bordes rugosos. A las 48 horas en la muestra con sobreexpresión se destaca la presencia de células en la periferia del esferoide, el borde es aún más rugoso y esto se acentúa a las 72 horas con mayor presencia de células en la periferia incluso con mayor distancia. En el control el proceso de compactación se consolidó a las 72 horas sin presencia de invadopodios o células en la periferia.

Como se observó, la línea HCC1395 desarrolla un fenotipo invasivo al tener sobreexpresado FOXC1 dando un comportamiento diferencial desde las 48 horas del ensayo donde observamos que hay una mayor presencia de células en la periferia del pozo. Estas características correlacionan con la pérdida del contorno homogéneo del esferoide y la aparición de invadopodios a las 72 h.

Los resultados de la evaluación de la formación del esferoide de la línea MDAMB231 en medio DMEM (condiciones normales de cultivo) se observa en la figura 12.

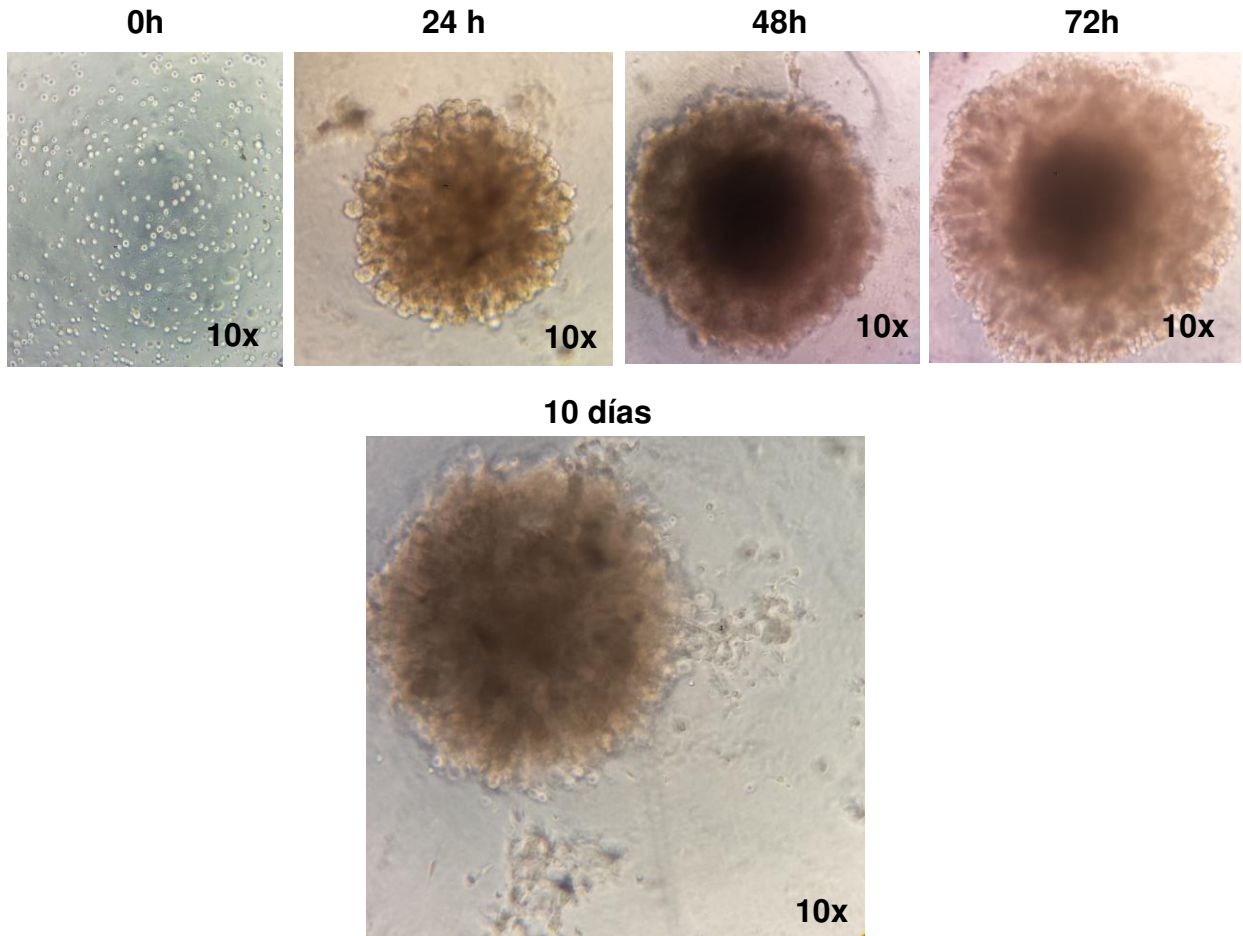
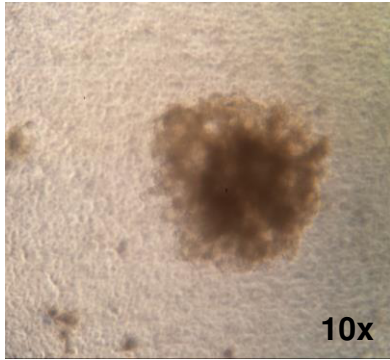


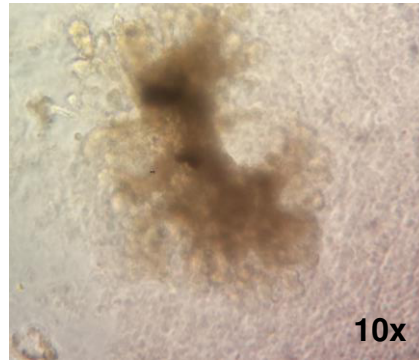
Figura 12. Evaluación de la formación del esferoide e invasión de la línea MDAMB231. El seguimiento de la invasividad inherente de la línea celular se documentó hasta los 10 días donde el proceso de compactación tuvo lugar a las 24 horas. La invasión se observó desde las 24 horas con la nula presencia del borde definido, en su lugar se observó un borde creciente con múltiples invadopodios que aumentan su longitud a las 72 horas y a los 10 días se observa la total invasión del pozo de cultivo con invadopodios en la periferia del pozo.

Para el ensayo de evaluación de la invasión en la línea MDABMB231 con silenciamiento se tomaron las condiciones control del ensayo, así como el medio OptiMEM. Como se observa en la figura 13 la invasión se ve afectada por el nivel de expresión de FOXC1.

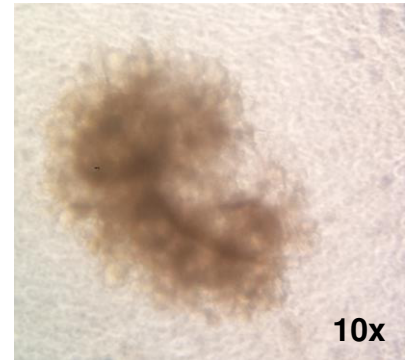
Silenciamiento de FOXC1



siRNA Scramble



siRNA GAPDH



- Mayor compactación
- Forma conservada
- Compactación irregular
- Forma alargada irregular
- Invadopodios presentes

Figura 13. Evaluación de la invasión en línea MDAMB231 con silenciamiento de FOXC1. Se observa que el proceso de compactación se concreta a las 48 horas sin embargo la forma característica del esferoide no se presenta en las condiciones control de siRNA Scramble y siRNA GAPDH donde hay una curvatura que semeja una media luna no compacta con múltiples invadopodios alrededor del esferoide.

Como se observa en la figura 13, la invasión en la línea MDAMB231 se vio afectada debido al silenciamiento de FOXC1 debido a que el control de transfección del gen GAPDH y el control negativo Scramble no concretaron la compactación homogénea del esferoide ni obtuvieron la forma característica esférica, el borde del mismo se vio afectado presentando múltiples invadopodios y células en la periferia del pozo.

Por su parte, el silenciamiento de FOXC1 muestra la preservación de su forma esférica y el borde más definido, el proceso de compactación se llevó a cabo de forma eficiente y esto contrasta con las características nativas de la línea celular sin transfección en medio DMEM donde se determinó que tiene la capacidad de invadir de forma inducible.

La invasión celular en las líneas MDAMB 231 y HCC1395 se ve afectada dependiendo del nivel de expresión de FOXC1.

Discusión

La transición epitelial mesenquimal es un proceso biológico que permite que una célula epitelial polarizada con morfología apico-basal, que normalmente interactúa con la membrana basal a través de su superficie basal, experimente múltiples cambios bioquímicos que le permitan asumir un fenotipo de células mesenquimales, capacidad migratoria, invasividad, elevada resistencia a la apoptosis y un gran aumento de la producción de componentes de la matriz extracelular (Lamouille et al., 2014).

La conclusión de un EMT se señala por la degradación de la membrana basal subyacente y la formación de una célula mesenquimal que puede migrar lejos de la capa epitelial en la que se originó. Una serie de distintos procesos moleculares están comprometidos con el fin de iniciar una EMT y permitir que llegue a su finalización. Estos incluyen la activación de los factores de transcripción, la expresión de proteínas de células-superficie específicas, la reorganización y expresión de proteínas de citoesqueleto, la producción de enzimas de degradación de ECM y los cambios en la expresión de microRNAs específicos (Kalluri & Weinberg, 2009). De manera selectiva, los factores involucrados también se usan como biomarcadores para demostrar el cambio fenotípico de una célula a través de una EMT (Figura 3).

La proliferación excesiva de células epiteliales y la angiogénesis son marcadores de inicio y crecimiento temprano de los cánceres epiteliales primarios. La adquisición subsiguiente de invasividad, inicialmente manifestada por la invasión a través de la membrana basal, se cree que anuncia el inicio de las últimas etapas de un proceso que conduce eventualmente a la diseminación metastásica, con consecuencias potencialmente mortales. Los controles genéticos y los mecanismos bioquímicos subyacentes a la adquisición del fenotipo invasivo y la posterior propagación sistémica de la célula cancerosa han sido áreas de investigación intensiva. En muchos de estos estudios, la activación de un programa EMT se ha propuesto como el mecanismo crítico para la adquisición de fenotipos malignos por células de cáncer epitelial.

Muchos estudios de ratón y experimentos de cultivo celular han demostrado que las células de carcinoma pueden adquirir un fenotipo mesenquimal y expresar marcadores mesenquimales como α -SMA, FSP1, vimentina y desmina. Estas células se observan típicamente en el frente invasivo de los tumores primarios y se consideran como las células que eventualmente entran en etapas subsiguientes de la invasión-metástasis en cascada, es decir, intravasación, transporte a través de la circulación, extravasación, formación de micrometástasis y finalmente, la colonización (el crecimiento de pequeñas colonias en metástasis macroscópicas) (Ray et al., 2010; Sizemore & Keri, 2012) como se observa en la figura 14.

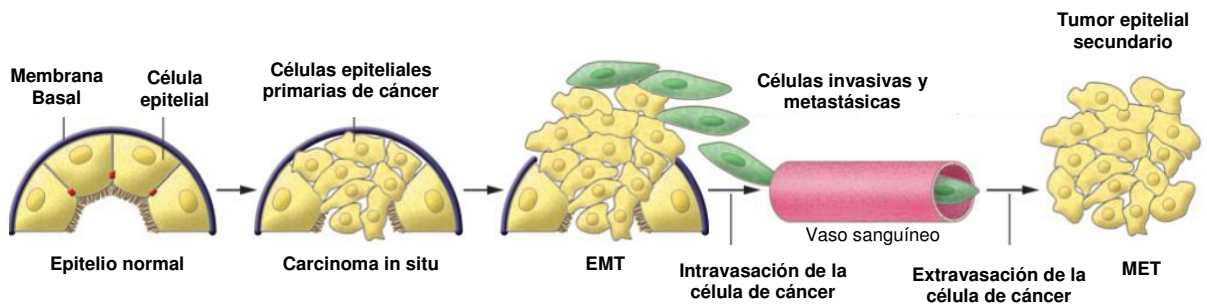


Figura 14. Contribución de la EMT a la progresión del cáncer modificado de Lamulli, 2009. Se describe el proceso general por el cual las células epiteliales unidas a la membrana basal pierden adherencia y se dividen en forma descontrolada, degradan la matriz extracelular y llegan a vasos sanguíneos donde migran para generar un segundo tumor.

Las células cancerosas migratorias derivadas de EMT establecen típicamente colonias secundarias en sitios distantes que se asemejan, a nivel histopatológico, al tumor primario del que se originaron; por consiguiente, ya no presentan los fenotipos mesenquimatosos atribuidos a células de metástasis de carcinoma. La conciliación de este comportamiento con el papel propuesto de EMT como facilitador de la diseminación metastásica requiere la noción adicional de que metástasis de las células cancerosas debe arrojar su fenotipo

mesenquimal a través de un MET durante el curso de la formación de tumores secundarios.

La tendencia de las células cancerosas diseminadas a sufrir el MET probablemente refleja los microambientes locales que encuentran después de la extravasación en el parénquima de un órgano distante, posiblemente la ausencia de las señales heterotípicas que experimentaron en el tumor primario que fueron responsables de inducir el EMT en primer lugar (Du et al., 2012; Jensen et al., 2015; J Wang et al., 2012). Estas consideraciones indican que la inducción de un EMT es probablemente un mecanismo de importancia central para la progresión de los carcinomas a una etapa metastásica e implica MET durante el proceso de colonización posterior.

En el presente trabajo identificamos que los marcadores de la EMT que se expresaron diferencialmente con el silenciamiento de FOXC1 fueron: FN1, SNAI1, CDH1, SNAI2, VIM. Adicionalmente demostramos que los marcadores MMP7, CDH2 y TJP1 no presentaron una expresión diferencial significativa al tiempo de 72 horas de silenciamiento en la línea TNBC metastásica. Por su parte, los marcadores de la EMT que se expresaron diferencialmente con la sobreexpresión de FOXC1 fueron MMP7, SNAI1, SNAI2, FN1. Mientras que CDH2, VIM, CDH1 y TJP1 no presentaron una expresión diferencial con la sobreexpresión de FOXC1 a las 48 horas en la línea TNBC primaria. De interés, los marcadores que se afectan en ambas líneas celulares después de su transfección fueron: *CDH1*, *FN1*, *VIM* y *SNAI2*. Con ello, se propone que estos último son genes candidatos potenciales para ser regulados por FOXC1 debido a la relación que conservan tanto en el silenciamiento como en la sobreexpresión, respectivamente.

La EMT es un proceso complejo en el cual intervienen más de 20 genes (Laomullie, et al. 2004), entre los que destacan los factores de transcripción, como FOXC2, que comparte un sitio de unión al DNA conservado de la familia Forkhead (Mani, et al. 2007), al igual que otros miembros de la familia FOX que participan en la EMT.

La familia de factores de transcripción Forkhead Box constituyen una lista importante en el proceso de regulación de la EMT en diversos tipos de cáncer, se sabe que esta familia conserva un dominio de unión al DNA conservado, por lo que nuestros resultados corresponden a lo reportado anteriormente por otros autores que describen interacciones entre miembros de esta familia con CDH1, FN, VIM, SNAIL2, CDH2 como se detalla en la tabla 8.

Tabla 8. Factores de transcripción de la familia FOX y su relación con marcadores de la EMT.

Factor de transcripción	Disminuye expresión	Aumenta expresión	Referencia
FOXC2	CDH1 (E-Cadherina)	FN (<i>Fibronectina</i>), VIM (<i>Vimentina</i>), CDH2 (<i>N-Cadherina</i>)	(Mani, et al. 2007)
FOXF1	CDH1 , <i>claudina1</i> , <i>occludina</i> , <i>desmogleína</i> , <i>desmoplaquina</i>	FN , CDH2	(Nilsson, et al. 2010)
FOXQ1	CDH1	FN , CDH2 , VIM	(Qiao, et al. 2011)
FOXO3A	CDH1	SNAIL1	(Belguise, et al. 2007)
FOXA1	CDH1	FN	(Song, et al. 2010)
FOXA2	CDH1 Y <i>TJP1</i> (ZO1)	FN , VIM , CDH2 , SNAIL1 , SNAIL2	(Song, et al. 2010)

Los resultados del silenciamiento y la sobreexpresión de FOXC1 en este trabajo concuerdan con las referencias bibliográficas, demostrando que FOXC1 modula principalmente a CDH1, FN, VIM y SNAIL2. La sobreexpresión de

FOXC1 en la línea HCC1395 promueve la invasión celular, capacidad que la línea no posee por naturaleza al ser de un tumor primario. La asociación inequívoca de los niveles de *FOXC1* con el resultado clínico del cáncer de mama puede explicarse, al menos en parte, por el efecto reportado de *FOXC1* sobre las funciones de las células BLBC (Figura 2). Proporcionando un mecanismo para la noción de que el BLBC alberga una alta expresión del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y su respectiva actividad, Wang demostró que *FOXC1* puede activar la señalización NF- κ B mediante el aumento de la proteína p65 / RelA afectando la estabilidad a través de la regulación con la interacción de peptidil-propil cis-trans isomerasa NIMA1 y su expresión en células BLBC. *FOXC1* es activado por la vía de señalización NF- κ BC1 que media la proliferación inducida, la migración y la invasión de las células BLBC (Sizemore & Keri, 2012). Otro estudio demostró que la función promotora de la invasión de *FOXC1* también puede depender de la regulación positiva de la expresión de las metaloproteinasas 7 (MMP7), que fue apoyada por el hallazgo de su silenciamiento esto en un modelo de línea celular donde *FOXC1* inducía la expresión de MMP7 de la línea de células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas MCF10A (Sizemore & Keri, 2012).

La EMT es un proceso que precede a otros fenómenos como lo son la migración y la invasión, lo que forma parte de un proceso aún más complejo que es la metástasis a distancia (Douglas, 2010). Las pacientes con TNBC presentan una alta tasa de riesgo de metástasis a distancia principalmente a pulmón y cerebro. La expresión de *FOXC1* está regulando 4 marcadores de EMT que son importantes para el proceso y pueden explicar el fenotipo agresivo y de alta invasión que presentan este tipo de tumores.

El silenciamiento de *FOXC1* en la línea MDAMB231 (TNBC Metastásico) fomentó la compactación y formación del esferoide a diferencia del control negativo y Scramble. A diferencia del ensayo de formación del esferoide con medio DMEM al utilizar el medio OPTIMEM se observó una interferencia

marcada por lo que se infiere que el medio de cultivo para la transfección está afectando la compactación y forma del esferoide.

Se observó una limitada capacidad invasiva en los controles a diferencia del primer ensayo de formación de esferoide en DMEM. Por lo que el método de transfección para el silenciamiento de FOXC1 no es compatible con el ensayo de invasión en cultivo en tercera dimensión.

Conclusiones

Se obtuvo un silenciamiento del 65% de la expresión de FOXC1 en la línea MDA-MB 231 (TNBC metastásica).

La máxima sobreexpresión de FOXC1 en la línea HCC1395 (TNBC primaria) se observó a las 48 horas.

Se realizó la estandarización de las sondas correspondientes a los marcadores de la EMT. La eficiencia de reacción fue superior a 0.89 y la estabilidad con el gen endógeno GAPDH se determinó como adecuada al tener una pendiente menor a 0.2 por lo que cumplieron con las características necesarias para continuar con el ensayo.

La expresión de FOXC1 afecta a los marcadores CDH1, VIM, FN1 y SNAI2 de la EMT que corresponden inversamente a la expresión de FOXC1. Estos genes se proponen como los principales candidatos a estar dentro de la red de regulación de FOXC1.

Los niveles de expresión de FOXC1 afectan el proceso de transición epitelial-mesenquimal, así como la invasión celular en las líneas evaluadas en el ensayo de cultivo celular en tercera dimensión.

Aportaciones

El presente trabajo nos da una aproximación para explicar mecanismos moleculares de agresividad y alta capacidad de invasión de los tumores de las pacientes con TNBC, procesos precedentes a la metástasis a distancia característica altamente conservada en estas pacientes.

Contemplamos que la expresión de FOXC1 está íntimamente ligada a el proceso de invasión modificando la expresión de 4 marcadores de la EMT (FN1, VIM, CDH1 y SNAI1). A pesar de no ser un regulador maestro se demostró que la expresión de FOXC1 afecta la invasión celular confiriendo esta característica a una línea celular que no tenía esta característica de forma nativa.

Perspectivas

Para dar continuidad al presente trabajo se establecen objetivos a desarrollar tales como:

- Determinar la expresión de FOXC1 y marcadores de la EMT a nivel de proteína con Western Blot de los ensayos de silenciamiento y sobreexpresión.
- Evaluar la invasión celular con otro modelo *in vitro* como Membranas Transwell la cual es una estrategia ampliamente utilizada en ensayos para determinar migración e invasión celular.
- Realizar inmunomarcaje de marcadores EMT en cultivo en tercera dimensión para demostrar los principales marcadores involucrados en el proceso de la EMT y su localización en el esferoide tumoral.

Referencias:

- American Cancer Institute. (2017a). Family Cancer Syndromes. Retrieved July 4, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/family-cancer-syndromes.html>
- American Cancer Institute. (2017b). What Is Cancer? - National Cancer Institute. Retrieved July 4, 2017, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- American Cancer Society. (2017). How is cancer diagnosed? Retrieved July 4, 2017, from <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/testing-biopsy-and-cytology-specimens-for-cancer/how-is-cancer-diagnosed.html>
- Bernard, P. S., Parker, J. S., Mullins, M., Cheung, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., ... Perou, C. M. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(8), 1160–1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>
- Berry, F. B., Saleem, R. A., & Walter, M. A. (2002). FOXC1 Transcriptional Regulation Is Mediated by N- and C-terminal Activation Domains and Contains a Phosphorylated Transcriptional Inhibitory Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(12), 10292–10297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110266200>
- Bidard, F. C., Conforti, R., Boulet, T., Michiels, S., Delaloge, S., & André, F. (2007). Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 “triple-negative” breast cancers [5]. *Annals of Oncology*, *18*(7), 1285–1286. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm360>
- Carey, L. a, Perou, C. M., Livasy, C. a, Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., ... Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *295*(21), 2492–502. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>

- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(6024). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/331/6024/1559>
- Choices, N. (2017). Cancer - Signs and symptoms - NHS Choices. Retrieved from <http://www.nhs.uk/Conditions/Cancer/Pages/Symptoms.aspx>
- Chu, I. M., Lai, W.-C., Aprelikova, O., El Touny, L. H., Kouros-Mehr, H., & Green, J. E. (2013). Expression of GATA3 in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells induces a growth inhibitory response to TGF β . *PloS One*, 8(4), e61125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061125>
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502–511. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072367>
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S., & Turashvili, G. (2012). Europe PMC Funders Group The genomic and transcriptomic architecture of 2 , 000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>.The
- Dejeux, E., Rønneberg, J. A., Solvang, H., Bukholm, I., Geisler, S., Aas, T., ... Tost, J. (2010). DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Molecular Cancer*, 9(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-68>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. a., ... Narod, S. a. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Du, J., Li, L., Ou, Z., Kong, C., Zhang, Y., Dong, Z., ... Lu, J. (2012). FOXC1, a target of polycomb, inhibits metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1396-3>
- Duncan, J. A., Reeves, J. R., & Cooke, T. G. (1998). BRCA1 and BRCA2

proteins: roles in health and disease. *Molecular Pathology : MP*, 51(5), 237–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193517>

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, G. 2015 D. and I. I. and P. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, 388(10053), 1545–1602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)

Han, B., Bhowmick, N., Qu, Y., Chung, S., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2017). FOXC1 : an emerging marker and therapeutic target for cancer, (December 2016), 1–7. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.48>

Han, B., Qu, Y., Jin, Y., Yu, Y., Deng, N., Wawrowsky, K., ... Cui, X. (2015). FOXC1 Activates Smoothed-Independent Hedgehog Signaling in Basal-like Breast Cancer. *Cell Reports*, 13(5), 1046–1058. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.063>

Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., ... Yang, J. (2010). Correction for Taube et al., Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 19132. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015095107>

Ihemelandu, C. U., Leffall, L. D., Dewitty, R. L., Naab, T. J., Mezghebe, H. M., Makambi, K. H., ... Frederick, W. a. (2007). Molecular Breast Cancer Subtypes in Premenopausal and Postmenopausal African-American Women: Age-Specific Prevalence and Survival. *Journal of Surgical Research*, 143(1), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.03.085>

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>

- Jensen, T. W., Ray, T., Wang, J., Li, X., Naritoku, W. Y., Han, B., ... Ray, P. S. (2015). Diagnosis of Basal-Like Breast Cancer Using a FOXC1-Based Assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, *107*(8), djv148-djv148. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv148>
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., & Kikkawa, F. (2007). Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.31.2.277>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420–8. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, *1*(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/35101031>
- Kume, T., Deng, K.-Y., Winfrey, V., Gould, D. B., Walter, M. A., & Hogan, B. L. (1998). The Forkhead/Winged Helix Gene Mf1 Is Disrupted in the Pleiotropic Mouse Mutation congenital hydrocephalus. *Cell*, *93*(6), 985–996. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81204-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81204-0)
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(3). <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lin, Z., Sun, L., Chen, W., Liu, B., Wang, Y., Fan, S., ... Li, J. (2014). human tongue cancer cells by targeting FOXC1. <https://doi.org/10.1111/cas.12499>
- Liu, Y., Han, L., Bai, Y., Du, W., & Yang, B. (2017). Down-regulation of MicroRNA-133 predicts poor overall survival and regulates the growth and invasive abilities in glioma. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *0*(0), 1–5. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1304551>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates

- cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Massagué, J., Krakowski, A. R., Dunham, E. E., Wang, L., Bandyopadhyay, A., Berdeaux, R., ... Moses, H. L. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- Mears, a J., Jordan, T., Mirzayans, F., Dubois, S., Kume, T., Parlee, M., ... Walter, M. a. (1998). Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly. *American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1316–1328. <https://doi.org/10.1086/302109>
- Mirzayans, F., Lavy, R., Penner-Chea, J., Berry, F. B., & Takahashi, N. (2012). Initiation of Early Osteoblast Differentiation Events through the Direct Transcriptional Regulation of Msx2 by FOXC1. *PLoS ONE*, 7(11), e49095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049095>
- Nishimura, D. Y., Swiderski, R. E., Alward, W. L. M., Searby, C. C., Patil, S. R., Bennet, S. R., ... Sheffield, V. C. (1998). The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nature Genetics*, 19(2), 140–147. <https://doi.org/10.1038/493>
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). *Breast Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. PDQ Cancer Information Summaries*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389406>
- Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerbäck, S., & Carlsson, P. (1994). Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *The EMBO Journal*, 13(20), 5002–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957066>
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 265–273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Rakha, E. a. (2007). Are triple negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res.*, 9, 404. <https://doi.org/10.1186/bcr1827>

- Rakha, E. a., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-like breast cancer: A critical review. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(15), 2568–2581. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
- Rakha, E., Ellis, I., & Reis-Filho, J. (2008). Are Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer Synonymous? *Clinical Cancer Research*, *14*(2), 618–618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1943>
- Ray, P. S., Bagaria, S. P., Wang, J., Shamonki, J. M., Ye, X., Sim, M.-S., ... Giuliano, A. E. (2011). Basal-like breast cancer defined by FOXC1 expression offers superior prognostic value: a retrospective immunohistochemical study. *Annals of Surgical Oncology*, *18*(13), 3839–47. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1657-8>
- Ray, P. S., Wang, J., Qu, Y., Sim, M.-S., Shamonki, J., Bagaria, S. P., ... Cui, X. (2010). FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. *Cancer Research*, *70*(10), 3870–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4120>
- Rhodes, L. V., Martin, E. C., Segar, H. C., Miller, D. F. B., Buechlein, A., Rusch, D. B., ... Collins-burow, B. M. (n.d.). Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer, *6*(18).
- Rice, R., Rice, D. P. ., Olsen, B. R., & Thesleff, I. (2003). Progression of calvarial bone development requires Foxc1 regulation of Msx2 and Alx4. *Developmental Biology*, *262*(1), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00355-5)
- Shamir, E. R., Pappalardo, E., Jorgens, D. M., Coutinho, K., Tsai, W.-T., Aziz, K., Ewald, A. J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *The Journal of Cell Biology*, *204*(5). Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/204/5/839>
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, *29*(34), 4741–51.

<https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>

- Sizemore, S. T., & Keri, R. A. (2012). The forkhead box transcription factor FOXC1 promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7 (MMP7) expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(29), 24631–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375865>
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G. M., ... Martens, J. W. M. (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Research*, *68*(9), 3108–3114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5644>
- Smith, R., Zabaleta, a, Kume, T., Savinova, O., Kidson, S., Martin, J., ... John, S. (2000). Haploinsufficiency of the transcription factors {FOXC1} and {FOXC2} results in aberrant ocular development. *Human Molecular Genetics*, *9*(7), 1021–1032. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.7.1021>
- Sun, J., Ishii, M., Ting, M.-C., & Maxson, R. (2013). Foxc1 controls the growth of the murine frontal bone rudiment by direct regulation of a Bmp response threshold of Msx2. *Development*, *140*(5), 1034–1044. <https://doi.org/10.1242/dev.085225>
- T?mer, Z., & Bach-Holm, D. (2009). Axenfeld?Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *European Journal of Human Genetics*, *17*(12), 1527–1539. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.93>
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., & Yang, J. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin- low and metaplastic breast cancer subtypes, *107*(35), 15449–15454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004900107>
- Tkocz, D., Crawford, N. T., Buckley, N. E., Berry, F. B., Kennedy, R. D., Gorski, J. J., Mullan, P. B. (2012). BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene*, *31*(32), 3667–3678. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.531>

- Wang, D. S., Zhang, H. Q., Zhang, B., Yuan, Z. B., Yu, Z. K., Yang, T., ... Jia, X. X. (2016). miR-133 inhibits pituitary tumor cell migration and invasion via down-regulating FOXC1 expression, *1*(1), 1–10.
- Wang, J., Li, L., Liu, S., Zhao, Y., Wang, L., & Du, G. (2016). FOXC1 promotes melanoma by activating MST1R / PI3K / AKT pathway and is associated with poor prognosis in melanoma, *7*(51), 84375–84387.
- Wang, J., Ray, P. S., Sim, M.-S., Zhou, X. Z., Lu, K. P., Lee, A. V., ... Cui, X. (2012). FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF- κ B signaling. *Oncogene*, *31*(45), 4798–802. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.635>
- Yoshida, M., Hata, K., Takashima, R., Ono, K., Nakamura, E., Takahata, Y., ... Yoneda, T. (2015). The transcription factor Foxc1 is necessary for Ihh?Gli2-regulated endochondral ossification. *Nature Communications*, *6*, 6653. <https://doi.org/10.1038/ncomms7653>
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., ... Haber, D. a. (2013). NIH Public Access, *339*(6119), 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>. Circulating
- Mani, S. A. et al. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *104*, 10069–10074 (2007). 268.
- Nilsson, J. et al. Nuclear Janus-activated kinase 2/ nuclear factor 1-C2 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition by repressing Forkhead box F1. *Cancer Res.* *70*, 2020–2029 (2010). 269.
- Qiao, Y. et al. FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers. *Cancer Res.* *71*, 3076–3086 (2011). 270.
- Belguise, K., Guo, S. & Sonenshein, G. E. Activation of FOXO3a by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate induces estrogen receptor α expression reversing invasive phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res.* *67*, 5763–5770 (2007). 271.

Song, Y., Washington, M. K. & Crawford, H. C. Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 70, 2115–2125 (2010).