



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Instituto Nacional de Medicina Genómica**

Tesis de licenciatura

Efecto de la inhibición de CBF- β en procesos asociados a la tumorigenicidad

Presenta:

Karla Estefanía Hernández González

Que para obtener el título de Bióloga

Director de Tesis

Dra. Magali Espinosa Castilla

Asesor interno

Edelmiro Santiago Osorio

México, Distrito Federal, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo fue elaborado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, bajo la tutoría de la Dra. Magali Espinosa Castilla y el asesoramiento del Dr. Edelmiro Santiago Osorio jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

"Así pues, ¿qué es la vida? Es un artístico caos controlado, un conjunto de reacciones químicas tan maravillosamente complejas que dio lugar al cerebro de los mamíferos que ahora, en forma humana, escribe cartas de amor y utiliza ordenadores de silicio para calcular la temperatura de la materia en el origen del universo"

—Lynn Margulis

Agradecimientos

“Una persona usualmente se convierte en aquello que él cree que es. Si yo sigo diciéndome a mí mismo que no puedo hacer algo, es posible que yo termine siendo incapaz de hacerlo. Por el contrario si yo tengo la creencia que si puedo hacerlo, con seguridad yo adquiriré la capacidad de realizarlo aunque no la haya tenido al principio”

—Gandhi

La materia que me conforma y muchos de los pensamientos que me habitan, son producto de un par de personas que decidieron unir sus vidas, mis padres, que hasta la fecha, con una admirable dedicación y esfuerzo cuidaron de mí y me guiaron con los mejores ejemplos y consejos, siempre preocupados por ofrecerme lo mejor y que jamás perciera, llegó el momento en que las cosas ya no dependían de ellos totalmente, la niña creció y ya había aprendido como se abría la puerta hacia la calle, y entonces, la muestra de amor más grande, depositaron en su confianza en mí, y aunque no muy seguros del trabajo que habían logrado conmigo, me dejaron experimentar y enfrentar al mundo y sus sorpresas, y tras las advertencias siempre repetidas; tanto que las puedo enlistar en este instante junto con las veces que se volvieron realidad y entonces regresaba corriendo, mojada, sucia, llorando y preguntando ¿qué había hecho mal?, y entonces ahí estaban, siempre a mi lado.

Nada de lo anterior tendría sabor si no les cuento cómo mi hermano favorito (y no es por que sea el único), ha estado en todos los momentos de mi vida ya sea para ayudar, o simplemente hacer o decir algo que no cambia el resultado de nada. Simplemente, es como “la enzima que cataliza la reacción...” y hace que todo sea más fácil y que sin él no conocería cosas tan importantes como: destapar una cer-

veza, la diferencia entre la tarjeta roja y amarilla, jugar videojuegos, usar las nuevas tecnologías y actualizaciones, la diferencia entre hardware y software, Android e IOS, entre miles de destrezas más. Y debo mencionar que a pesar de todo, es de las pocas personas que sabe pronunciar CBF- β , es mi diseñador preferido, mi guardaespaldas, pero sobre todo, me ha dado el mejor regalo, mis dos sobrinos, de ese par nunca podré escapar, son el único ruido en nuestra casa después de la licuadora, y llenan de alegría mis días y noches.

Aquí quisiera agradecer a todos mis amigos, desde los de la primaria que es increíble tener a personas tan cercanas que me conocen perfectamente desde hace tantos años y han estado conmigo en más momentos malos que buenos. Mis amigos de la Preparatoria Nacional no.7, la etapa más despreocupada de mi corta vida, pero la más llena de experiencias, hemos crecido y aprendido todos juntos y más que amigos somos una familia, que espero se mantenga por muchos años más. Mis amigos de la FES Zaragoza, son tan distintos todos ellos y yo tan feliz de haberlos conocido, y aunque algunos los conocí casi al final de la carrera, actualmente me da mucho gusto poder seguir contando con ellos. El laboratorio 4 es una leyenda totalmente, desde los mandos superiores hasta los subordinados, y los más pequeños que resultaron ser muy eficientes. Pero sobre todo a mi gran equipo, esos dos hombres, que siempre me estuvieron presionando para ser una mejor estudiante pero más precisamente una mejor mujer, a su manera muy particular, aunque muy didáctica y poco apropiada. No puedo dejar de mencionar a mis tres fantásticos, fueron mi salvación en la carrera y sin ellos no estaría escribiendo esto, los momentos que pasamos son de mis recuerdos más preciados; quiero ser muy puntual con una pequeña y aunque muy pequeña la más grande amiga y la hermana que nunca tuve, pero que tampoco elegí, se metió en mi vida, yo en la suya, y ya no podemos estar una sin la otra. Otra persona que me enseñó muchas cosas y muy variadas, resultó pasar de ser un completo extraño a ser una persona muy cercana, que siempre me apoyo con su experiencia y tuvo la paciencia de explicarme aquellos temas ni tan complejos, pero que mi mente no comprendía leyendo, de mis mejores compañeros de estudio, y una de las personas que más aprecio.

Si tuviera que agradecer por los buenos momentos seguramente estaría olvidando la mitad de mí, pues los instantes de felicidad abarcan la mayoría de mis recuerdos, pero todo lo que he aprendido bien, es debido a las malas y no tan malas experiencias, por lo cual debería agradecer también a aquellas personas que significaron un

obstáculo a vencer, gracias por impulsarme a llegar al límite y darme cuenta de que puedo ser mejor de lo que creía, necesito muchas personas así a lo largo de mi vida.

Quiero terminar agradeciendo a algo y no a alguien, a un equipo y a un deporte, que es más bien una forma de vida. He aprendido que el miedo no sirve y sólo limita, que cuando te caes tienes que levantarte y continuar la competencia, que es contigo misma y con nadie más. Nada que valga la pena es fácil, la diferencia entre soñar y poder, se llama disciplina. La primera persona que tiene que estar convencida de lo que quiere lograr eres tú y una vez que has decidido comenzar a correr, no puedes bajar la velocidad pues lo único que importa son tus metas, que se encuentran frente a ti y no detrás. Y sobre todo, tener en cuenta, que si la caída de verdad fue dura, tienes un equipo completo y un coach, que confían en ti.

Un reconocimiento realmente especial a mi directora de tesis, que me enseñó la mejor manera de enseñar, estoy profundamente agradecida por todo su apoyo tanto académico como moral. A mi asesor que más que asesor de tesis, resultó ser mi asesor de vida. Mis maestros, grandes maestros que tuve y que me han dado la grandiosa oportunidad de tener una amistad fuera del aula, pero que siempre tendrán todo mi respeto y admiración.

Esa mañana de 1953, luego de largas semanas de tratar infructuosamente de resolver el problema de la estructura del ácido desoxirribonucleico, James Watson miró casualmente una escalera de caracol, y en ese momento tuvo un chispazo genial. ¡Lo tengo, Francis! -exclamó-, ¡El ADN es una doble hélice en forma de escalera de caracol! -Tienes razón- confirmó entusiasmado su colega Francis Crick, ¡Son dos cadenas enrolladas una alrededor de la otra!

“Una estructura tan bonita tenía, por fuerza, que existir...”

-James Watson, Francis Crick 1953

Índice

Resumen	1
1. Antecedentes	3
2. Cáncer	4
3. Tumorigénesis	7
3.1. <i>El desarrollo del cáncer como un proceso de múltiples etapas</i>	7
3.2. <i>Iniciación del tumor</i>	8
3.3. <i>Promoción del tumor</i>	9
3.4. <i>Conversión maligna</i>	11
3.5. <i>Progresión del tumor</i>	11
4. Oncogenes y genes supresores de tumores	13
5. Características de las células tumorales	14
5.1. <i>Alta señalización proliferativa</i>	14
5.2. <i>Evasión de supresores de tumores</i>	15
5.3. <i>Resistencia a la muerte celular</i>	15
5.4. <i>Capacidad replicativa (inmortalidad)</i>	16
5.5. <i>Inducción de angiogénesis</i>	17
5.6. <i>Activación de invasión y metástasis</i>	19
6. CBF	20
7. RUNX	21


8. RUNX y Cáncer	22
8.1. RUNX1	23
8.2. RUNX2	24
8.3. RUNX3	25
9. CBFβ y cáncer	26
10. Justificación	27
11. Hipótesis	28
12. Objetivo general	28
12.1. Objetivos específicos.....	28
13. Metodología	28
13.1. Líneas Celulares.....	28
13.2. Cultivo celular.....	28
13.3. Curva de Puromicina.....	29
13.4. Cristal Violeta	29
13.5. Transfección Estable.....	29
13.6. Extracción de ARN total y Retrotranscripción (RT).....	30
13.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
13.8. Proliferación celular	31
13.9. Formación de esferoides	31
13.10. Crecimiento sobre agar suave.....	32
14. Resultados	33
14.1. Inhibición de CBF β	33
14.2. Proliferación celular.....	34
14.3. Formación de esferoides.....	35
14.4. Crecimiento sobre agar suave	35
15. Discusión	36
16. Conclusiones	40

17. ANEXOS	41
17.1. <i>Anexo 1. ARNi (ARN de interferencia)</i>	41
17.2. <i>Anexo 2. Esferoides</i>	43
17.3. <i>Anexo 3. Curva de puromicina (resultados)</i>	43
17.4. <i>Anexo 4. Técnica Liquid Overlay</i>	44
18. Bibliografía	47

Símbolos y abreviaturas

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARN.....	Ácido ribonucleico
Rb.....	Retinoblastoma
CBF β	Core Binding factor β (Factor β de unión al ADN)
RUNX	Runt asociated (asociado a Runt)
ARNi	ARN de interferencia
TPA	Acetato de tetradenocailforbol
FC.....	Factores de crecimiento
NGF	Neuronal growth factor (Factor de crecimiento neuronal)
EGF	Epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidermal)
PDGF	Plateled-derived growth factor (Factor derivado de plaquetas)
HGF	Hepatocyte growth factor (Factor de crecimiento de hepatocitos)
FGF	Fibroblast growth factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)
TGF β	Transforming growth factor beta (Factor beta de crecimiento transformante)

TNF	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
TSG	Tumor suppressor genes (Genes supresores de tumores)
GAP's	GTPasa activator proteins (Proteínas activadoras de GTPasa)
GTP	Guanosin triphosphate (Guanosin trifosfato)
VEGF-A	Vascular-endothelial growth factor-A (Factor-A de crecimiento vascular endotelial)
TSP-1	Thrombospodin 1 (Trombospodina 1)
VEGFR1-3	Vascular-endothelial growth factor 1-3 receptor (Recepto del factor 1-3 de crecimiento vascular endotelial)
EMC	Extracellular matrix (Matriz extracelular)
CAMs	Cellular adhesion molecules (Moléculas de adhesión celular)
CBF	Core binding factor (Factor de unión al ADN)
PEBP2	Polyomavirus enhancer-binding protein 2 (Potenciador 2 del virus polioma)
Runx.....	Runt associated Drosophila m. (Proteínas asociadas al dominio Runt)
AML.....	Acute Myeloide Leukemia (Leucemia mieloide aguda)
TEL/ETV6.....	ETS translocation variant 6 (Variante 6 de la translocación de ETS)
ETO/MTG8	Eight-twenty-one/ Myeloid transforming gene on chromosome 8 (Ocho-veintiuno/ gen mieloide transformante en el cromosoma 8)
M4Eo.....	AML with bone marrow eosinophilia (AML con eosinofilia en la médula ósea)
SMMHC(gen)	Smooth muscle myosin heavy chain (cadena pesada de miosina del músculo blando)



MYH11 (proteína)	Myosin heavy chain 11 (cadena pesada de miosina 11)
RT	Retrotranscripción
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
v/v	Volumen/volumen
μl	Microlitro
ml	Mililitro
min	Minutos
nm	Nanómetros
cm ²	Centímetros cuadrados

Efecto de la inhibición de CBF- β en procesos asociados a la tumorigenicidad

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales, en los cuales las células transformadas son el resultado de alteraciones acumuladas en el ADN. Desde el siglo pasado, diferentes estudios han sugerido que las mutaciones son la causa de la progresión del cáncer. Las herramientas de la genética se han empleado sistemáticamente para examinar como surgen los cánceres. A finales de la década de los 70s se clonaron los primeros oncogenes que estimulan la proliferación celular. En los 80s, varios grupos aislaron el gen Rb (Retinoblastoma) y otros genes supresores tumorales.

La inactivación de supresores de tumor y la activación de oncogenes son eventos claves en la formación de un tumor, pero se ha propuesto que varios de estos eventos (típicamente de 4 a 10 en el caso de los cánceres humanos) son requeridos para generar un estado tumorigénico completo. Estos eventos no ocurrirían durante la vida de una célula o de un organismo, si los cambios individuales hubiesen ocurrido a una tasa normal de mutación espontánea. Sin embargo, muchos cánceres están asociados a la inestabilidad genética que incrementa significativamente el número de estos eventos.

Décadas de estudio apoyan el hecho de que la carcinogénesis es un proceso constituido por varios eventos que resultan de la acumulación de mutaciones en los linajes celulares.

CBF β , es un factor de transcripción que al unirse con ciertas proteínas permiten su interacción con el ADN y de esta manera funciona como activador o represor de muchos genes blanco. Se han reportado estudios en donde se involucra a CBF β en

el proceso carcinogénico. Recientemente, se han reportado mutaciones significativas de CBF β en células de cáncer de mama y de cáncer cérvicouterino.

Hasta ahora, no se ha estudiado el papel de CBF β como un gen supresor de tumores, ni su participación conjunta con miembros de la familia RUNX. Tampoco se conocen las vías de señalización involucradas en la regulación de su expresión, así como su papel efector en los estímulos que llevan a desencadenar la proliferación celular desregulada en el cáncer.

Para conocer si CBF β está involucrado en procesos tumorigénicos como la proliferación, formación de esferoides tumorales, y crecimiento independiente de anclaje, empleamos un ARNi específico contra CBF β para inhibir su expresión en células MCF-7 de cáncer de mama. Los resultados mostraron que la inhibición de CBF β no modifica la proliferación celular, sin embargo, interfirió significativamente disminuyendo el crecimiento independiente de anclaje, así como la capacidad de las células para formar esferoides tumorales. Las mutaciones en CBF β , así como su baja expresión se han asociado al desarrollo tumoral, lo cual nos demuestra la dualidad de la función de CBF β sobre los procesos asociados a la tumorigenicidad.

Antecedentes

Desde épocas remotas el cáncer ha acompañado a la humanidad: hacia el año 400 a.C. Hipócrates lo nombró Karkinos que en griego significa cangrejo [1]. Esta enfermedad es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos y químicos), que producen la degeneración de las células originando lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos, que inicialmente se localizan en algún órgano o tejido (in situ) y al no ser tratados oportunamente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis) [2].

A nivel mundial, el cáncer es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2012, fallecieron 8.2 millones de personas a causa de esta enfermedad, lo que representa el 13% del total de las muertes, y estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013). En la región de las Américas fallecieron 1.2 millones de personas en 2008 por cáncer; afectando a los hombres principalmente en la próstata, pulmón, colorectal y estómago; y a las mujeres en la mama, pulmón, colorectal y cervicouterino (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2013) [2].

En México, según la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. Durante el 2011 de los diagnósticos realizados en los hospitales 56.6% pertenecen a tumores malignos, en la población infantil y joven (menores de 20 años) la proporción de egresos hospitalarios por neoplasias malignas en relación con los tumores en general es más alta que en la población adulta (70.6 y 53.2%, respectivamente) [2]

A pesar de los esfuerzos de las instituciones para diagnosticar y atender a las personas con cáncer, muchos mexicanos mueren por esta causa. En 2012, del total de defunciones, 13% se debieron a algún tumor y de éstas, 93.5% por neoplasias malignas [2].

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades comunes, que se caracterizan por la proliferación descontrolada de las células y tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes [3] (Fig.1).

Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica, se requieren varias mutaciones en varios genes y esto ocurre a través de mucho tiempo, a veces años. Una célula sana presenta una morfología definida y encaja a la perfección en el entorno que la rodea, responde a señales ambientales y se divide sólo cuando el balance de señales estimuladoras e inhibitoras precedentes del exterior favorecen la división celular. Este proceso está sometido a un riesgo permanente de mutaciones genéticas: cambios aleatorios que alteran las moléculas reguladoras de la célula [4].

Las mutaciones son el resultado de la interacción de distintos factores que ocasionan daños espontáneos al ADN, las cuales otorgan ventajas de sobrevivencia y crecimiento a la célula portadora sobre las células normales. Entre las características que adquieren las células de cáncer son: la insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, el potencial para dividirse ilimitadamente, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis y la habilidad de metástasis e invasión de tejido sano [5].

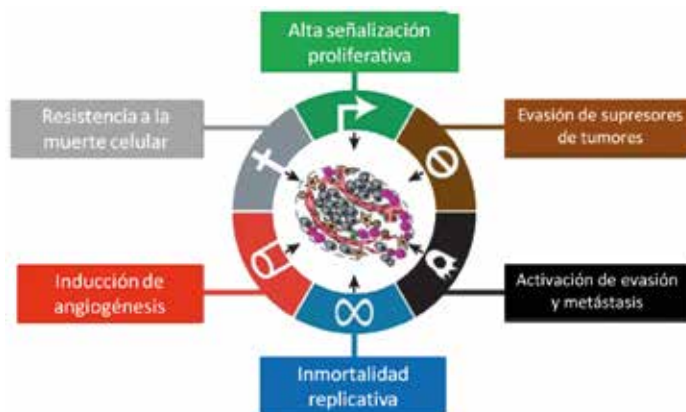


Fig.1 Características genóticas y fenotípicas de las células cancerígenas. Tomado de Hanahan D, Weinberg R., 2011 [5].

El cáncer comienza en una célula que dará origen a una población celular completa, es decir, que es de origen monoclonal. Esa célula alterada, escapa a los controles que anteriormente habíamos mencionado y se vuelve “anárquica”, iniciando una generación de más “células anárquicas”, que a su vez pueden inducir a cambios similares, en las células que la rodean [6].

La génesis y el desarrollo tumoral son el resultado de numerosas alteraciones que se producen en el ADN [7]. La mutación genética conduce a la modificación de las proteínas que codificaría el gen normal, y si esto progresa, facilitaría un crecimiento neoplásico. Estas mutaciones pueden tener básicamente dos orígenes:

- A. Los cánceres heredados por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales.

El análisis citogenético ha permitido individualizar algunos genes cuyas mutaciones han demostrado ser de predisposición familiar, representando aproximadamente entre el 5 y 10% de los casos diagnosticados, esto ocurre independientemente del sexo de la descendencia. Lo cual implica que en la mayoría de los casos las mutaciones se adquieren en las células somáticas, por tanto, no son susceptibles a heredarse [8].

- B. Los cánceres esporádicos, donde las alteraciones genéticas dependen de los mutágenos ambientales (virus, radiaciones o sustancias químicas).

Los agentes que pueden causar cáncer son muchos y muy variados incluyendo el estilo de vida. El primer reporte conocido viene de John Hill, quien en 1761 se percató de la conexión entre el desarrollo de cáncer nasal y el excesivo uso de tabaco, pero quizá la mayor aportación entre la asociación del cáncer con la exposición al medio ambiente, fue de 1949-1950 en donde dos grupos de epidemiólogos reportaron que las personas fumadoras tienen una probabilidad 20 veces mayor de padecer cáncer de pulmón que aquellas personas que no fuman [18]. El 80% de los cánceres esporádicos, se deben a exposición ambiental, esto sustentado por la gran cantidad de mutágenos de esta clase y su capacidad para iniciar tumores como los carcinógenos químicos existentes y los distintos tipos de cáncer que promueven. Por ejemplo: el cigarrillo predispone al cáncer de pulmón y de vejiga, las aminas aromáticas al cáncer de vejiga; la aflatoxina al cáncer de hígado; el benceno a las

leucemias; y todos estos carcinógenos comparten una misma propiedad, causan mutaciones, a este tipo de carcinógenos se les conoce como factores iniciadores de tumores [9].

Por otro lado, existen factores denominados promotores de tumores, que no son mutagénicos por sí mismos, pero que tienen la capacidad de causar cáncer si previamente han sido expuestos a algún factor iniciador de tumores. El factor promotor de tumores más estudiado, son los ésteres de forbol, como el acetato de tetradenocailforbol (TPA), el cual posee un activador artificial de la proteína cinasa C, y por lo tanto activa una parte de la ruta de señalización intracelular de fosfatidilinositol. Este tipo de sustancias son causantes de cáncer por exposición en altas frecuencias y sólo después de haber sido expuestas a algún mutagénico iniciador [10,11].

Cabe destacar que existen dos mecanismos por los cuales los genes pueden alterarse:

1. Genético, donde se producen alteraciones estructurales del genoma por cambios en la disposición de los propios genes o de sus bases, como son las mutaciones, translocaciones o deleciones.
2. Epigenético, en acciones moleculares por alteraciones de las enzimas o de los sustratos de las mismas, tal es el caso de la metilación de las bases. Este mecanismo generalmente compromete simultáneamente los dos alelos y la hipometilación generalmente conduce a la mayor expresión de los genes, por lo tanto una mayor cantidad de enzima metiltransferasa que inhibe la metilación, puede conducir a la mayor expresión de oncogenes. Esta enzima generalmente se encuentra elevada en los tejidos tumorales [12].

Tumorigénesis

El desarrollo del cáncer como un proceso de múltiples etapas

La tumorigénesis también conocida como carcinogénesis, es el mecanismo a través del cual se desarrolla una neoplasia maligna. El desarrollo del cáncer es conocido por ser un proceso de múltiples etapas, concepto que fue propuesto por primera vez en 1948 por Berenblum y Schubikin [13], el cual fue sustentado más tarde por distintos estudios [14,15,16]. En la actualidad, la oncología reconoce 4 fases: Iniciación, promoción, conversión maligna y progresión (Fig.2).

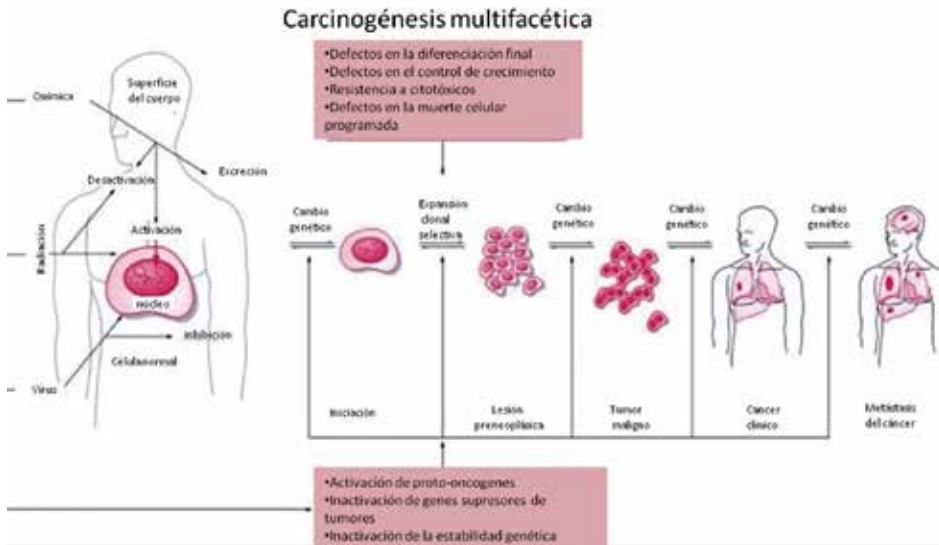


Fig. 2 La carcinogénesis como un proceso multifacético. La tumorigénesis es un proceso multifacético, que puede conceptualizarse en 4 etapas: Iniciación, promoción, conversión maligna y progresión. La activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores son resultado de eventos mutacionales ocasionados por daño al ADN. La acumulación de estas mutaciones, y no necesariamente en un orden específico, constituyen el progreso tumoral o tumorigénesis (Pharmaceuticalintelligence.com, online consultada 11/06/2015).

Iniciación del tumor

Esta etapa como su nombre lo indica, se encuentra a cargo de factores iniciadores, que induzcan una mutación mediante la modificación de la estructura molecular del ADN, medio que puede ser necesario pero no suficiente para iniciar un tumor.

Los agentes que actúan en la primera etapa son: físicos, químicos o biológicos. Los carcinógenos físicos, están constituidos por las radiaciones que dañan ionizando las bases y facilitan la formación de radicales libres que son moléculas altamente reactivas que pueden interactuar directamente con ADN. Estos fenómenos pueden afectar dañando genes responsables del control del ciclo celular como el gen de la proteína p53, o estimulando factores de crecimiento como la IL-1 y 6 [18]. Las fuentes radiantes pueden surgir de la metodología diagnóstica o terapéutica como así también por exposición a los rayos solares en forma persistente o por emanaciones de radón de los suelos [9].

Los carcinógenos químicos son conocidos por causar cambios en las secuencias nucleotídicas, como el 3-metilcolantreno, α -benzopireno, 1-2,5-6 dibenzantraceno, 2'-3-dimetil-4-amino-azobenceno, 2-naftilamina, etc. que son productos comunes de la combustión y algunos de ellos hidrocarburos, pueden perturbar células y tejidos actuando como inhibidores o activadores de enzimas que a su vez podrían facilitar la acción de esos carcinógenos en el daño genómico y activar algunos oncogenes por ejemplo, el ácido nitroso provoca la eliminación del grupo amino de las bases y el gas mostaza añade grupos metilo o etilo en las bases, algunas sustancias se parecen a las bases y provocan un emparejamiento erróneo durante la replicación al cambiar una base por otra por ejemplo el 5-bromouracilo puede incorporarse en vez de timina y la 2-aminopurina puede sustituir a la adenina. Ciertas moléculas se intercalan en la cadena polinucleotídica del ADN y provocan mutaciones por inserción o delección. Son por ejemplo, la acridina y la proflavina que son dos colorantes y el benzopireno, que se encuentra en el humo del tabaco y en los alquitranes, provoca mutaciones al intercalarse entre las dos cadenas del ADN [17,18].

En la dieta diaria se ingieren diferentes tóxicos mutágenos como la cafeína, la nicotina, el opio, la morfina, quinina y muchos edulcorantes, así como la mayoría de las drogas como el LSD. Se ha visto que hay especies químicas presentes natu-

ralmente en productos de consumo cotidiano como algunos compuestos tóxicos que las plantas emplean para defenderse de ser depredadas, o compuestos que se generan durante la cocción de los alimentos como la carne roja, que a altas temperaturas genera compuestos como aminas heterocíclicas que son potencialmente mutagénicas. Aunque los organismos han desarrollado un sistema de adaptación relacionado a su capacidad individual de detoxificación muchas de las conversiones químicas llevadas a cabo en el hígado y algunas bacterias en el colon originan productos metabólicos que en ocasiones siguen ocasionando daños al material genético [18].

La aflatoxina (aislada de los alimentos contaminados con un tipo de hongo) se considera oncogénica para las células hepáticas. Se atribuyen efectos genotóxicos a los compuestos policlorados contenidos en insecticidas y plaguicidas, así como también productos de la manufactura de materiales eléctricos y plásticos formando parte de los contaminantes ambientales, que llegan a los seres vivos a través del aire, del agua y los alimentos [9].

Los carcinógenos biológicos como los virus, actúan introduciendo sus propias oncoproteínas al genoma de la célula afectada con lo que la misma cambiará su código normal, por el que le imponen los oncogenes virales. Tal es el caso del papiloma virus humano, del Epstein Bar y de las hepatitis B y C. Los oncogenes virales se ubican generalmente en las proximidades de proto-oncogenes o de oncogenes supresores, activando a los primeros y desactivando a los segundos [19,20,]

Promoción del tumor

La promoción del tumor comprende la expansión clonal selectiva de células pre-neoplásicas. En el cáncer, las células se multiplican sin control, invaden tejidos próximos y se diseminan hacia órganos distantes produciendo allí el tumor en proceso llamado metástasis. Cada una de estas fases de la progresión tumoral conlleva condiciones adversas que eliminan a la mayoría de las células cancerosas. Sin embargo, y en virtud de su heterogeneidad genética, los tumores malignos albergan minorías de células con los rasgos necesarios para vencer estos obstáculos. Así pues, en cada estadio del desarrollo tumoral nuevas minorías se quedan seleccionadas, convirtiéndose en la estirpe dominante. Si dicha estirpe, además, retiene la capacidad propagadora del tumor actuando como célula madre del cáncer, el tumor se propaga. En definitiva, se trata de la selección del más fuerte, bajo presiones

ambientales, de entre una población de individuos celulares genéticamente diversificados que habitan el ecosistema reactivo de nuestros tejidos [21].

La promoción, representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan los TSG y los receptores de los factores de crecimiento, como así también la angiogénesis y degradación de la matriz extracelular [17].

Los factores de crecimiento FC, son péptidos producidos por las mismas células o por células vecinas y actúan como facilitadores de la mitosis incorporando en fase S a algunas células que se encuentran en fase G0 o G1 prolongada [22]. Los FC se sintetizan en una célula y luego migran al espacio intercelular, ejerciendo sus acciones sobre células vecinas [23]. Los primeros FC descubiertos fueron el de crecimiento neuronal (NGF) y el epidérmico (EGF), a los que se sumaron muchos más, entre ellos el derivado de plaquetas (PDGF), el de hepatocitos (HGF), el de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros [17].

Algunas hormonas ejercen acciones similares a estos factores peptídicos una vez que fueron captadas por los receptores de membrana o intracitoplasmáticos. Por ejemplo, es reconocido el efecto proliferativo de los estrógenos sobre los epitelios mamarios y los del tracto genital; las gonadotropinas hipofisarias, estimulan especialmente el epitelio ovárico; la prolactina ejerce su acción en el ámbito de la mama y también en el ovario; la insulina de origen pancreático y el factor simil insulina, de origen hepático, son verdaderos factores de crecimiento [24,25].

Algunas citocinas, que son productos de distintos tipos de células, pueden ejercer efectos modulatorios o inhibitorios de la proliferación; tal es el caso de factor TGF β (Factor beta de crecimiento transformante), interferón- γ y del TNF o factor de necrosis tumoral que antagonizan a los factores de crecimiento, por lo cual regularmente son blancos mutacionales, lo cual evita su correcto funcionamiento, tal es el caso de TGF β cuya función es mantener la homeóstasis celular y prevenir la progresión tumoral mediante la regulación de diferentes vías transduccionales que promueven procesos como proliferación, diferenciación, sobrevivencia y adhesión, pero además también tiene la capacidad de regular el microambiente celular, sin embargo las células transformadas tienen la capacidad de evadir o peor aún transformar la influencia supresiva de la vía de TGF β pues muchos estudios han revelado que las formas patológicas de TGF β promueven la señalización requerida

para el crecimiento tumoral, invasión, evasión del sistema inmunológico, diseminación y metástasis [26].

Conversión maligna

Es la transformación de una célula pre-neoplásica en una que exprese el fenotipo maligno. Este proceso requiere de cambios genéticos adicionales, pero para que estos se lleven a cabo es importante que la etapa de promoción la cual solo contribuye al proceso carcinogénico mediante la expansión de la población celular inicial, no haya entrado en regresión antes de haberse sometido a la transformación maligna. Sin embargo, la probabilidad relativamente “baja” de que ocurra la transformación maligna, puede ser incrementada sustancialmente mediante la exposición de células preneoplásicas a agentes cancerígenos, este proceso es mediado a través de la activación de proto-oncogenes así como la inactivación de genes supresores de tumores [27,28]

Progresión del tumor

Implica la expresión del fenotipo maligno así como la tendencia de las células transformadas a adquirir más características agresivas todo el tiempo, debido a la alta inestabilidad genética que presentan además de su descontrolado crecimiento [29]. Esta etapa implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia. Las células normales, se encuentran “ancladas” en un hábitat que les es propio.

El contacto con las células circundantes controla su propia división celular y existen moléculas de adhesión que las mantienen próximas y permiten la transmisión de señales de una con otra; las células normales son incapaces de atravesar la membrana basal que las separa del tejido conjuntivo sub-basal de donde obtiene los materiales que la nutren; tampoco tienen capacidad de introducirse en los capilares sanguíneos o linfáticos, con excepción de los linfocitos que tienen esta particularidad [17]. Estas características están codificadas también por los genes de la misma célula, que al ser transformadas obtienen modificaciones estructurales y funcionales, que como ya se ha mencionado incluyen la activación y desactivación de genes que regulan estos procesos [30].

Debido a que el cáncer es una enfermedad derivada de un conjunto de mutaciones en células somáticas, es importante entenderlo desde el punto de vista molecular.

Para ello, necesitamos conocer e identificar mutaciones relevantes y descubrir la manera en que contribuyen al origen y desarrollo del cáncer. Encontrar células mutadas puede resultar sencillo en el aspecto de que sobresalen de las demás debido a que son favorecidas por la selección natural y llaman la atención al tener la capacidad de formar tumores, sin embargo, el verdadero problema radica en identificar puntualmente las mutaciones de los genes a lo largo de todo el ADN de las células cancerosas. Además es importante mencionar que de manera “natural” como consecuencia de la inestabilidad genética, a lo largo del ciclo celular se producen errores espontáneos, que en cada duplicación celular (pueden llegar hasta 50 divisiones). Éstos errores se van acumulando constituyendo un factor intrínseco de riesgo, pero estas mutaciones muchas veces, no tienen efectos significativos para contribuir a la carcinogénesis, sin embargo estos errores espontáneos constituyen un factor intrínseco de riesgo lo cual puede dificultar un poco más la distinción de aquellas mutaciones con un papel importante dentro del desarrollo de esta enfermedad [17].

A pesar de los obstáculos que esto pueda representar, se han logrado identificar más de 100 genes frecuentemente alterados en cánceres humanos, pero es claro que se espera identificar muchos más.

Oncogenes y genes supresores de tumores

Los oncogenes y los genes supresores de tumores (por sus siglas en inglés TSG) son generalmente considerados para regular procesos de desarrollo y diferenciación, y la desregulación de estos genes permite el desarrollo del cáncer [31]. Dependiendo de cómo estos genes afecten a estos procesos, pueden ser clasificados en dos grandes grupos: genes supresores de tumores, cuyos productos finales inhiben el crecimiento celular, y proto-oncogenes los cuales promueven en general, la proliferación y diferenciación celular, mientras que a los alelos mutados de estos últimos se les conoce como oncogenes.

Los proto-oncogenes son activados por varios procesos como: 1) por una mutación somática, la cual involucra ya sea, un cambio en las bases que conformen una secuencia dentro del ADN, un intercambio de bases, o la pérdida o ganancia de una o más bases 2) mediante la formación de múltiples copias de algún gen en específico, también conocido como amplificación, en donde este gen evidentemente incrementará su expresión y 3) mediante la activación del gen debido a la presencia de algún promotor fuerte cerca o unido a él, esto puede ocurrir debido a la presencia de un virus invasor, pero en humanos este fenómeno ocurre generalmente a partir de una translocación cromosomal [5].

Los genes más representativos de este grupo son los pertenecientes a la familia de proteínas Ras (H, K y N-Ras), que se han encontrado en tumores humanos de diferente origen y en diferentes proporciones. Estas proteínas se encuentran unidas a la lámina interna de la membrana plasmática y controlan muchos procesos, pero particularmente regulan el crecimiento celular. En el caso de las proteínas Ras oncogénicas, portan mutaciones generalmente en los codones 12 ó 61, que suprimen su sensibilidad hacia las GAPs (proteínas activadoras de GTPasa), manteniéndolas siempre unidas a GTP y por ende constitutivamente activas [32].

Al contrario de lo anterior, la pérdida funcional de los genes supresores de tumores se da a través de la delección de porciones de cromosomas o la completa pérdida de éste [5]. Cabe mencionar que la mutación de un solo alelo perteneciente a un proto-oncogén es suficiente para permitir la transformación tumoral, por lo cual estas mutaciones son consideradas dominantes. Mientras que, para que un TSG pierda su función y que la transformación ocurra, la mutación se debe de dar en ambos alelos.

Los TSG se pueden clasificar en dos grupos: promotores y vigilantes. Los promotores son los tradicionales TSGs, como p53 y Rb, cuyas mutaciones permiten la transformación directamente permitiendo la proliferación celular, mientras que los vigilantes son aquellos encargados justamente de asegurarse de la integridad del genoma, como aquellos genes involucrados en la reparación del ADN, pero a pesar de que no controlan la proliferación directamente, al haber células con mutaciones en estos genes, son más propensas a sufrir mutaciones posteriores en otros genes, incluyendo proto-oncogenes y otros TSGs [33].

Características de las células tumorales

Alta señalización proliferativa

Las células que conforman tejidos normales se encuentran cuidadosamente bajo control en cuanto a la producción y liberación de señales que les permiten entrar en un proceso tanto de crecimiento como de división celular, y de este modo se logra una homeostasis en cuanto al número celular y con ello el mantenimiento de la arquitectura y función del tejido normal. Las células tumorales sin embargo, mediante una desregulación de estas señales tienen la capacidad de autoregularse, convirtiéndose en las dueñas de su propio destino. Estas señales de crecimiento en su mayoría, llegan a través de factores de crecimiento que se unen a receptores membranales, que generalmente contienen un dominio intracelular tirosina-cinasa, los cuales ocasionan un cambio conformacional que activa una determinada vía de señalización intracelular que regula tanto el crecimiento como la entrada al ciclo celular. Así mismo estas mismas señales en ocasiones influyen en otros mecanismos celulares, como sobrevivencia celular y procesos metabólicos [34].

La manera por la cual las células tumorales adquieren estas numerosas señalizaciones mitogénicas tiene diversas alternativas, una de ellas hace referencia a que las células tumorales producen sus propios ligandos a los cuales podrán responder mediante la expresión de sus respectivos receptores, resultando en una estimulación proliferativa autócrina. Por otro lado, las células tumorales podrían estar enviando señales a las células normales que conforman el estroma asociado al tumor, para de esta manera estimularlas y de una forma recíproca, éstas reciban factores de crecimiento. De manera alternativa la señalización proliferativa puede encontrarse desregulada por elevados niveles de proteínas receptoras en la superficie celular, provocando una hiper-reacción o hiper-activación, sin embargo es limitada a la

presencia de factores de transcripción. Así mismo, se ha hablado de la presencia de alteraciones estructurales en las moléculas receptoras que facilitan las interacciones con sus ligandos [35].

Por otro, lado recientemente se ha demostrado que una elevada señalización de oncoproteínas como Ras, Myc y Raf puede provocar respuestas contrarrestantes como senescencia celular que es un estado no proliferativo pero viable, o en su defecto apoptosis [36, 37].

Evasión de supresores de tumores

Además de la capacidad de inducir una alta señalización mitogénica, las células tumorales cuentan con poderosos programas que interrumpen de alguna manera los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Existen docenas de supresores de tumores que operan de varias maneras limitando el crecimiento celular y la proliferación, sin embargo estos supresores se han encontrado característicamente inactivados de una u otra forma en células tanto de animales como de humanos con cáncer. Los dos supresores de tumores prototipo en cáncer son las proteínas Rb y TP53, que actúan como nodos de operación central dentro de dos circuitos y gobiernan la decisión de si la célula proliferará o alternativamente activará la senescencia o programas de muerte celular [5].

Evidentemente el que exista alguna mutación en estos supresores desencadena una serie de procesos como la evasión de inhibición por contacto o la evasión de apoptosis por lo que se verá favorecido el proceso tumorigénico [38].

Resistencia a la muerte celular

El concepto de que la muerte celular programada es una barrera natural anticancerígena, surge a partir de la elucidación de este circuito apoptótico, pues se ha demostrado que es inducido en respuesta a distintos tipos de estrés fisiológicos como elevados niveles de señalización oncogénica, así como daño al ADN asociado a hiperproliferación.

La maquinaria apoptótica está compuesta por componentes reguladores río arriba y efectores río abajo. Los reguladores por su parte, están divididos en dos vías principales, una de ellas caracterizada por recibir y procesar señales de muerte ex-

tracelulares, la cual se conoce como vía extrínseca, que involucra moléculas como el ligando Fas y su respectivo receptor. Por otro lado, tenemos la vía intrínseca la cual responde a una serie de señales de origen intracelular. Sin embargo, ambas vías culminan en la activación de una familia de proteasas latentes llamadas caspasas (caspasa 8 y 9 respectivamente), las cuales comenzarán una cascada proteolítica (caspasas iniciadoras) para activar a las caspasas efectoras responsables de la ejecución de la fase apoptótica, en la cual la célula es progresivamente desintegrada en cuerpos apoptóticos y finalmente engullida ya sea por células vecinas o por células fagocíticas profesionales [38,39].

Las células tumorales comprenden una variedad de estrategias que limitan la apoptosis. Una de las más comunes es la pérdida de la función de TP53, importante sensor de daño al material genético que tiene la capacidad de inducir el circuito apoptótico [5]. Una vez activado transmite señales entre los componentes reguladores y efectores que comprenden moléculas pro-apoptóticas (Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Hrk, entre otras) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, mc1-1, etc.) que en conjunto controlan la muerte celular [5].

Otra forma de evadir la apoptosis es mediante la sobre-expresión de las mismas señales anti-apoptóticas o de supervivencia. Se sabe que Bcl-2 (por sus siglas en inglés B-cell leukemia/lymphoma-2) es una de ellas, esto significa que cuando hay altos niveles de dicha proteína, la célula hará todo lo posible por mantenerse viva, inducirá todo tipo de sistemas de defensa y detendrá el programa de muerte apoptótico, aún y cuando la célula se encuentre dañada genéticamente [40].

Capacidad replicativa (inmortalidad)

Para poder lograr formar una masa tumoral significativa resulta evidente que las células cancerígenas requieran de un potencial replicativo ilimitado. Sin embargo esta capacidad en contraste con las células de la mayoría de los tejidos normales, se encuentra limitada a un cierto número de ciclos tanto de crecimiento como de divisiones celulares. Múltiples estudios indican que los telómeros protegen los extremos cromosomales evitando que estos se fusionen uno con otro y que están directamente relacionados con el control proliferativo, debido a que los telómeros están compuestos por múltiples repeticiones de hexanucleótidos que se acortan progresivamente en células normales por cada división del material genético y eventualmente pierden la habilidad de proteger los extremos del ADN cromosómi-

co. Con ello, la longitud de los telómeros en una célula indicará cuantas generaciones sucesoras su progenie será capaz de producir antes de que los telómeros pierdan su función protectora permitiendo con ello la entrada a un estado apoptótico [41].

La telomerasa, es una ADN polimerasa que añade segmentos al ADN telomérico, sin embargo en células normales se encuentra ausente a diferencia de las células tumorales en donde es expresada a niveles significativos funcionalmente en su gran mayoría, lo cual, les otorga una capacidad replicativa ilimitada, denominada comúnmente como inmortalidad celular, pues la expresión de esta enzima esta correlacionada con la resistencia tanto a la senescencia que es un estado no proliferativo pero viable, como a la muerte celular programada. La inmortalidad que poseen las células tumorales ha sido atribuida a su habilidad para mantener una longitud adecuada del ADN telomérico y así evadir estas barreras naturales anti-proliferativas como son la senescencia y la apoptosis, y ésto logrado a través de la sobreexpresión de la polimerasa [38].

Inducción de angiogénesis

Al igual que un tejido en condiciones normales, las masas tumorales requieren ser provistos de nutrientes y oxígeno, así como la facilidad de evacuar desechos metabólicos y dióxido de carbono; la neovascularización tumoral generada por un proceso denominado angiogénesis, atiende estas necesidades. Durante la embriogénesis el desarrollo de vasculatura involucra el nacimiento de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos, proceso al que llamamos vasculogénesis, pero además requiere del surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, proceso al que se le denomina angiogénesis. En personas adultas o ya desarrolladas podemos observar procesos angiogénicos como un proceso fisiológico transitorio, por ejemplo, en la cicatrización de heridas o en el ciclo reproductivo femenino, pero una vez cumpliendo su objetivo este proceso regresa a su estado basal. En contraste con lo que ocurre con la tumorigénesis (formación del tumor), la angiogénesis se encuentra en constante actividad, originando vasculatura quiescente que continuamente ocasiona el brotamiento de nuevos vasos que ayudan al mantenimiento y a la expansión de los crecimientos neoplásicos [42].

Estudios completos han indicado que el interruptor angiogénico está controlado por una serie de factores que inducen o se oponen a la angiogénesis. Muchos de estos reguladores angiogénicos son proteínas señalizadoras que se unen a receptores

inhibidores y estimulantes presentes en la membrana de las células endoteliales. Los reguladores mayormente conocidos son VEGF-A (Factor-A de crecimiento vascular endotelial) como inductor, y TSP-1 (trombospondina-1) como inhibidor.

El gen VEGF-A codifica ligandos que están involucrados en controlar el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario y postnatal, y por lo tanto la sobrevivencia homeostática de las células endoteliales, así como situaciones fisiológicas y patológicas en el adulto. La vía de señalización de VEGF es regulada a múltiples niveles a través de tres receptores tirosina-cinasa (VEGFR1-3). La expresión génica de VEGF puede ser sobre expresada ya sea por la exposición a condiciones hipóxicas o por señalización oncogénica [43]. Además, los ligandos VEGF pueden encontrarse secuestrados en la matriz extracelular en formas latentes, que están sujetas a ser activadas por proteasas que degradan la matriz extracelular [44]. Otros señalizadores proangiogénicos son los miembros de la familia del FGF, los cuales se han relacionado con el mantenimiento de la angiogénesis del tumor cuando su expresión se encuentra por arriba de lo normal [45]. TSP-1 por el contrario funciona como inhibidor angiogénico que también se une a receptores membranales presentados por células endoteliales y de esta forma evoca señales supresoras que pueden contra atacar los estímulos pro-angiogénicos [46].

Los vasos sanguíneos producidos dentro de las masas tumorales representan una respuesta a un proceso angiogénico crónico además de una mezcla de señales pro-angiogénicas que provocan un desequilibrio aberrante evidente en la neovascularización tumoral que incluye: un brotamiento precoz de capilares, así como un cúmulo excesivo de vasos sanguíneos típicamente alargados y distorsionados, por los cuales la circulación sanguínea se torna inconstante, además se ha visto que presentan microhemorragias, sin dejar de mencionar los niveles anormales tanto proliferativos como apoptóticos [47].

Históricamente la angiogénesis ha sido percibida por ser importante únicamente cuando existe un tumor macroscópico con un rápido crecimiento, sin embargo, datos recientes han revelado que la angiogénesis también contribuye en la fase temprana premaligna a la progresión neoplásica, lo cual reafirma la particular relevancia de la angiogénesis dentro del estudio del cáncer [38].

Activación de invasión y metástasis

Es claro que un carcinoma que surge a partir de tejidos epiteliales, tiene la capacidad de progresar a estados con un mayor grado de malignidad y todo gracias a que estas células además de presentar un perfil que las distinguen de las células normales, presentan características que les permiten formar una masa de tumor y eventualmente metastatizarse a otras partes del cuerpo. Dentro de estas alteraciones podemos mencionar aquellas relacionadas con las interacciones célula-célula y célula-EMC (matriz extracelular) mediadas por las CAMs (moléculas de adhesión celular) . La reducción de la adhesión entre dos células y entre célula-EMC permite la formación de grandes masas de células pues las células cancerosas no muestran inhibición por contacto como lo hacen las células normales, y así pueden continuar creciendo aún cuando están rodeadas por otras células. Estas alteraciones en la adhesión celular también tienen efecto en la habilidad de las células para moverse. Las células cancerosas deben tener la habilidad de poderse mover y migrar para así poder propagarse, y la adhesión celular juega un rol muy importante en la regulación de la movilidad celular. La alteración mejor caracterizada es la baja expresión de E-caderina por las células tumorales. Esta proteína, es una molécula esencial en la adhesión célula-célula. Además mediante la formación de uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, la E-cadherina ayuda a mantener unidas a las células que forman los tejidos y a mantener la quiescencia dentro de éstos. Altos niveles de expresión de esta molécula han mostrado ser antagonista de la invasión o metástasis, y por el contrario, un estado reducido de su expresión es conocido por potenciar este fenotipo. La frecuente regulación a la baja y en ocasiones total inactivación de E-cadherina en carcinomas humanos, ha provisto un fuerte soporte al papel que juega esta molécula como supresor de esta capacidad neoplásica [48].

Existen muchos otros genes que codifican moléculas involucradas en las adhesiones celulares, las cuales se ha demostrado, se encuentran alteradas en muchos carcinomas altamente agresivos. Estas moléculas de adhesión normalmente están asociadas a la migración celular que ocurre durante la embriogénesis y procesos inflamatorios, en donde se encuentran sobre expresadas. Por ejemplo, N-cadherina es una molécula que se encuentra expresada en neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis, y se encuentra expresada en altos niveles en carcinomas invasores. Sin embargo, a la pérdida o ganancia de proteínas de adhesión no se le

atribuye todo el proceso migratorio, por lo cual los principales reguladores metastásicos permanecen desconocidos o carecen de validación funcional [49].

El proceso de invasión se compone de distintas etapas, muchas veces llamado cascada de invasión ó metástasis, que es descrito como una sucesión de cambios biológicos, comenzando con una invasión local, posteriormente la intravasación ejecutada por células linfáticas seguido por la infiltración de células tumorales a la lámina de los vasos sanguíneos mediante los cuales serán conducidas hacia el parénquima de tejidos distantes (extravasación), posteriormente continúa con la formación de pequeños nódulos de células neoplásicas (micrometástasis) y finalmente, el crecimiento de lesiones micrometastásicas a tumores macroscópicos, este último paso ha sido llamado colonización [38].

CBF

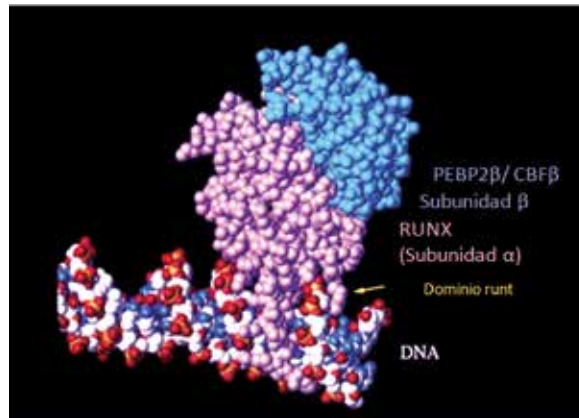
CBF es un factor de transcripción complejo que participa en el desarrollo osteoblástico, hematopoyético y neuronal [45]. Estructuralmente es un heterodímero compuesto por dos subunidades CBF α y CBF β . La subunidad CBF α es mejor conocida como RUNX, una familia de proteínas que tienen en común un dominio altamente conservado denominado runt, el cual es responsable de la unión al ADN y de la dimerización con la subunidad CBF β (Fig.2), la cual, por sí sola no tiene la capacidad de unirse al ADN, pero su afinidad incrementa cuando se une a CBF α estabilizando su extremo C-terminal [51].

CBF β es conocido como potenciador del virus polioma por sus siglas en inglés PEBP2 (polyomavirus enhancer-binding protein 2), pues fue utilizado como prueba para el estudio de diferenciación celular en ratones hace 20 años, en donde básicamente, se percataron de que PEBP2 o CBF β se encontraba ausente en células de carcinoma embrionario junto con ello, encontraron que líneas celulares tumorales de embriones murinos eran resistentes a la infección por varios virus, entre ellos el virus polyoma y así sucedía hasta que estas células comenzaban a diferenciarse que era cuando este factor PEBP2 se expresaba y que de hecho se trataba de un regulador del desarrollo; por lo tanto se convirtió en uno de los primeros factores empleados en el estudio de diferenciación y desarrollo en embriones en ratones [52].

Actualmente se ha logrado describir a fondo la estructura de este complejo factor de transcripción denominado CBF β y su interacción diferencial con la familia de proteínas RUNX [57] (Fig.3).

La familia CBF consiste en un grupo de factores de transcripción que juegan un papel muy importante en múltiples procesos como: Runx1 y CBF β son requeridos por las células troncales para la diferenciación y maduración del linaje hematopoyético [53]. Runx2 y CBF β están involucrados en la diferenciación de condrocitos y osteoblastos [54], mientras que Runx3 en la diferenciación de neuronas propioceptivas de los ganglios de la raíz dorsal y timopoyesis [55], así como de la proliferación y apoptosis de células del epitelio estomacal [56].

Fig.3 Estructura cristalizada del heterodímero CBF, con sus dos subunidades CBF β y CBF β que muestra el dominio Runt con los 134 aminoácidos de la región de unión a CBF β unido al ADN. Modificada de Yoshiaki Ito, 2004.



RUNX

Las proteínas RUNX (Relacionado a Runt) son factores de transcripción cruciales que regulan un amplio rango de procesos biológicos como la hemaopoyesis, la osteogénesis, la diferenciación de las neuronas, etc, por lo que dirigen el destino propio de la célula.

Tradicionalmente se describen como proteína que se une a CBF β , para formar un factor heterodimérico de unión al complejo CBF. En mamíferos se han descrito tres miembros de la familia de genes RUNX: RUNX1, RUNX2 y RUNX3, que son conocidos reguladores del desarrollo y se ha demostrado que son importantes en cánceres humanos.

Los genes RUNX codifican las subunidades alfa también conocido como: proteína de unión a PEBP2 y a CBF α , los cuales actúan como reguladores del desarrollo,

patrones de expresión específicos [63]. Como ya se mencionó antes, estos factores de transcripción se unen al ADN a través de una estructura conservada, conocida como dominio Runt, y comparten un común co-factor de unión, CBF β . Los genes RUNX tienen el potencial de codificar numerosas isoformas debido a diferentes promotores y splicing alternativo [65].

Sin embargo, el significado funcional así como su organización y potencial de codificación permanecen desconocidos. Se sabe que los factores RUNX en combinación con CBF β pueden actuar ya sea como activadores o represores de la expresión de diferentes genes blanco, pero la gran variabilidad que presentan las proteínas RUNX en cuanto al contexto celular se refleja en el gran número de factores de transcripción, coactivadores y co-represores que se ha visto interactúan con RUNX, lo cual complica en gran medida su estudio [63].

Así como su homólogo Runt en *Drosophila*, las proteínas RUNX en mamíferos parecen regular diversos procesos celulares durante el desarrollo en diferentes puntos, en donde el destino de la célula progenitora es balanceado entre proliferación, diferenciación, y muerte celular [64]. El potencial de los factores RUNX para regular estos procesos puede ser la clave de sus paradójicos roles en cáncer [61].

RUNX1

La primera evidencia de que la expresión desregulada de los genes RUNX contribuía a la carcinogénesis fue provista mediante el estudio de uno de los genes blanco de la leucemia mieloide aguda [59], en donde se identificó a RUNX1 también conocido como AML1. Desde entonces, muchas translocaciones que involucran a RUNX1 han sido descritas, y muchas de estas coinciden en el reemplazamiento del dominio de transactivación C-terminal por algún otro gen que ocasiona su fusión, e interrumpe la función normal de RUNX1 que es muy importante dentro de la maduración del linaje hematopoyético. Esta clase de translocaciones es casi exclusiva de leucemias mieloides, pero existen otro tipo de translocaciones como TEL-RUNX1, la cual se encuentra en un 20-25% de leucemias linfoblásticas agudas Pre-B, que se caracteriza por una excesiva proliferación de leucocitos inmaduros [65]. Generalmente los genes quiméricos generados tras las diferentes mutaciones, resultan en la inhibición de RUNX1, pues se ha demostrado que el efecto knock out de la fusión RUNX1-ETO que daba lugar a un fenotipo muy similar a aquel producido por el knock out de RUNX1, que

generaba una deficiencia en el proceso de hematopoyesis definitiva, lo cual sostiene que la proteína fusionada actúa como un antagonista dominante sobre el alelo que aún permanece normal [69]. Otra indicación de que la pérdida de la función de RUNX1 contribuye a la carcinogénesis, se observó a partir de la adición de su factor de unión al ADN, CBF β , involucrado en una frecuente translocación (Inv16) que genera la fusión de proteínas con una aparente función dominante negativa. La Inv 16 está específicamente asociada con el subtipo M4Eo de AML, y resulta de la yuxtaposición de CBF β con MYH11, lo cual genera un producto capaz de inhibir la función de RUNX1 perturbando la diferenciación de los granulocitos y contribuye al desarrollo de AML en modelos murinos[60].

Sin embargo, otros estudios demuestran que ciertas mutaciones están promoviendo la función de RUNX1 y de esta manera contribuyen también al desarrollo tumoral[66]. Goyama y col. [66] demostraron que RUNX1 es requerido para la supervivencia de las células de AML, sostienen que la pérdida parcial de la actividad de RUNX1 bloquea la maduración mieloide y mantiene el desarrollo adecuado de las células tumorales en AML, mientras que una mayor reducción de RUNX1, resulta en el arresto del ciclo celular y con ello la muerte celular. Aunado a esto, se le ha atribuido un potencial para acelerar la progresión de la fase G1 a la fase S en células mieloides 32Dcl3, así como su habilidad para rescatar la proliferación de células linfoides que expresan inhibidores dominantes negativos para este proceso [68].

Tanto la pérdida o ganancia de la expresión de RUNX1 tiene efectos tumorales. Por ejemplo, el síndrome de Down relacionado con leucemia aguda megacarioblástica, está relacionado con una copia extra de RUNX1, pues se sabe que el Síndrome de Down es ocasionado por una triploidía en el par 21 que almacena a RUNX1, si esto es cierto entonces una sobredosis de RUNX1 también resulta tumorigénica [67]. Estos descubrimientos resaltan la función dual que RUNX1 está teniendo, y resulta de gran interés examinar por que el nivel de la expresión de RUNX1 debe estar regulado tan precisamente.

RUNX2

RUNX2 fue identificado como PEBP2 α A en células 3T3 en ratones, inicialmente se llevaron a cabo experimentos para demostrar que la familia RUNX era la subunidad responsable de la unión al ADN de factores de transcripción heterodiméricos, sin embargo su papel fisiológico no era claro aún [70]

Los grupos de Komori y Otto (1997) mostraron que RUNX2 es esencial para la maduración de osteoblastos [71,72], y junto con los estudios realizados por Ducy 1997, revelaron que RUNX2 juega un papel clave en la osteogénesis [73]. Esto se relacionó con el descubrimiento de que la displasia cleidocraneal es causada por haploinsuficiencia de RUNX2 [74,75].

La actividad oncogénica de RUNX2 se demostró en ratones transgénicos en donde la sobreexpresión de RUNX2 alteraba el desarrollo de las células T y junto con C-Myc ectópico promovían la linfomagénesis [76].

RUNX3

RUNX3 se expresa ubiquitinizado en muchos tipos celulares incluyendo células epiteliales, mesenquimales y células sanguíneas, mientras que en células nerviosas, células epiteliales y hematopoyéticas del tracto gastrointestinal en adultos la expresión de RUNX3 es alta. Por lo cual, los experimentos con ratones deficientes de RUNX3 han mostrado una gran variedad de fenotipos [57].

Suk Chul Bae y colaboradores mostraron que la pérdida de la expresión de RUNX3, está relacionada con el cáncer gástrico [56,57]. En ratones deficientes de Runx3 (Runx3 $-/-$) se encontró una transformación hiperplásica de la mucosa gástrica, así como una alta resistencia por parte de las células epiteliales a la actividad inhibitoria de proliferación y a la apoptosis mediadas por TGF- β . La inactivación de RUNX3 en cáncer gástrico ocurre por la combinación de una deleción hemicigota, y el silenciamiento del gen debido a la hipermetilación de la región promotora, lo cual parece ocurrir tanto en etapas tempranas como durante la progresión tumoral [57].

Con lo mencionado anteriormente, es evidente que los genes RUNX presentan características como proto-oncogenes los cuales pueden ser activados mediante translocaciones, inserciones virales y amplificaciones, pero al mismo tiempo presentan características de genes supresores de tumores pues al ser inhibida su función normal contribuyen al desarrollo tumoral.

CBF β y cáncer

Paul Liu (1993) [60], logró identificar el gen involucrado en la inversión del cromosoma 16 relacionado con el subtipo M4Eo de AML. Este gen codificaba para MYH11, y consiste en la fusión de CBF β con el gen SMMHC (por sus siglas en inglés smooth muscle myosin heavy chain), lo cual colocó a CBF β como un gen potencialmente importante dentro de la oncología.

Mucho se ha publicado acerca de las proteínas RUNX y como estas influyen en el proceso tumorigénico tanto como oncogenes como supresores de tumores. Muchas de las funciones que lleva a cabo esta familia de proteínas requieren de CBF β , pues es el factor que les permite unirse al ADN y de esta manera funcionar ya sea como activadores o represores de muchos genes blanco.

Se han reportado estudios en dónde se involucra a CBF β en el proceso carcinogénico. Miyagawa y su grupo, realizaron estudios en carcinomas hepatocelulares y observaron que había una disminución en la expresión de RUNX1 y de RUNX3. Y que los niveles de expresión de su cofactor, CBF β , aún eran menores. Reportaron que la prevalencia en estos niveles bajos de RUNX1, RUNX3 y CBF β , incrementaron el progreso de lesiones precancerosas a carcinoma hepatocelular, sugiriendo que estos genes pueden estar involucrados en la hepatocarcinogénesis [77].

En carcinoma gástrico, el grupo de Ito Y., realizó varias investigaciones de RUNX3 en el cáncer gástrico, examinó la expresión de los genes RUNX1, de RUNX2 y de CBF β tanto en líneas de c. gástrico como en muestras primarias de este tipo de cáncer. Encontraron disminuciones significativas en los niveles de RUNX3, RUNX1 y de CBF β . Además, el porcentaje de disminución de RUNX1, RUNX3 y de CBF β se incrementaba conforme el estadio de cáncer progresaba, sugiriendo que RUNX1 y CBF β , junto con RUNX3, podrían participar en el desarrollo del cáncer gástrico [78].

Recientemente, se han reportado mutaciones significativas de CBF β en células de diferentes tipos de cáncer. Ellis y su grupo, realizaron análisis en biopsias de cáncer de mama y reportaron mutaciones en CBF β [79].

Nuestro grupo de investigación mostró que células de cáncer de mama de pacientes sin tratamiento, muestran mutaciones comunes en los genes, TP53, PIK3CA y

MAP3K1 y mutaciones en el factor CBF β [80]. Además en células de cáncer cervicouterino, con secuenciación de exoma completo (115 muestras), secuenciación de transcriptoma (79 muestras) y secuenciación de genoma completo (14 muestras), identificaron mutaciones, somáticas en CBF β en los adenocarcinomas [81]. Dichos resultados nos permiten pensar que CBF β participa en el desarrollo tumoral, sin embargo, aún no es claro qué este provocando exactamente, ni de qué manera lo esté haciendo, por ello resulta de gran interés delucidar de qué manera CBF β está implicado en el proceso carcinogénico.

Justificación

El cáncer es consecuencia de la activación de los oncogenes que estimulan el crecimiento y de la inactivación de los genes que normalmente inhiben la proliferación celular, denominados genes supresores del cáncer. Una gran proporción de los oncogenes y genes supresores de tumores codifican factores de transcripción. Los factores de transcripción regulan la expresión de una serie de genes blanco, y son a su vez el blanco de numerosas vías de transducción de señales fundamentales para el proceso de carcinogénesis. En condiciones fisiológicas, conjuntos enteros de genes con funciones similares son regulados corriente arriba por factores de transcripción altamente específicos, mientras que en el cáncer, la activación aberrante de estos factores conduce a la expresión desregulada de genes asociados con el desarrollo y progresión tumoral.

CBF β , es un factor que forma parte de un complejo protéico, que le permite unirse al ADN y de esta manera funcionar como factor transcripcional de muchos genes blanco que participan en procesos como la hematopoyesis, el desarrollo del esqueleto, entre otros. Además en diversos estudios se ha reportado que CBF β participa en el proceso carcinogénico. Recientemente, se han reportado mutaciones significativas de CBF β en células de cáncer de mama y de cáncer cervicouterino, apuntando a que CBF β está teniendo un papel importante dentro del desarrollo tumoral, sin embargo, aún no es claro qué este provocando exactamente, ni de qué manera lo esté haciendo, por ello resulta de gran importancia delucidar de qué manera CBF β está implicado en el proceso carcinogénico.

En consecuencia, los factores de transcripción son blancos atractivos para la terapia del cáncer ya que la inhibición de su función repercutirá en una amplia gama de respuestas celulares.

En este proyecto, se analizó el papel de CBF β en algunos procesos involucrados en la tumorigenicidad, observando el efecto de la inhibición de CBF β en la línea celular MCF7 sobre la proliferación, la formación de esferoides y el crecimiento independiente de anclaje.

Hipótesis

CBF β se ha encontrado mutado en varios tipos de cáncer, por lo tanto, la inhibición de CBF β modulará el proceso carcinogénico.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición de CBF β sobre procesos asociados a la formación y progresión tumoral.

Objetivos específicos

1. Analizar la efectividad del ARN de interferencia dirigido contra CBF β en la línea celular MCF7.
2. Estudiar el efecto de la inhibición de CBF β en los procesos de proliferación, formación de esferoides y crecimiento independiente de anclaje.

Metodología

1. Líneas Celulares

MCF7. Esta línea celular mantiene varias características del epitelio mamario diferenciado incluyendo la habilidad para procesar estradiol vía los receptores de estrógeno (RE+) citoplasmático y la capacidad para formar domos. Estas células expresan al oncogén WNT7B (ATCC, HTB-22).

2. Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10% de Suero fetal bovino (SFB, Invitrogen), incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ v/v. Para la criopreservación, se

preparó una suspensión de 2×10^6 células/ml/criovial en SFB más DMSO (10%), se congelaron gradualmente y se conservaron en nitrógeno líquido.

3. Curva de Puomicina

La Puomicina es un antibiótico que actúa sobre bacterias grampositivas, gram-negativas, amebas, protozoos, hongos y células de mamíferos, y es utilizada para demostrar la eficacia de transfecciones y/o transformaciones celulares.

Se realizó una curva de Puomicina con las siguientes concentraciones: 0.5, 0.7 y 1 microgramo/ml y se observaron los resultados a los 3 y 6 días de exposición [Anexo 3].

4. Cristal Violeta

Es un ensayo colorimétrico utilizado para la cuantificación nuclear del ADN y con ello la densidad celular, en respuesta a algún tratamiento, componente químico, nutrientes, etc.

El cristal violeta es un tinte que se acumula en el núcleo celular y que puede ser medido fotométricamente después de su solubilización. En breve, las células libres de medio y previamente lavadas con PBS1X, son fijadas con etanol al 70% durante 10 min a -20° C posteriormente se retira el etanol, se deja secar y se coloca el cristal violeta durante 10 min aproximadamente, una vez que se retira el tinte se lava con agua corriente y se deja secar. Por último se añade ácido acético para disolver el tinte y una vez disuelto, se lee a 590nm.

5. Transfección Estable

Se sembraron 1×10^6 células en cajas de 60 mm. Al día siguiente, las células con una confluencia entre 70-90% se transfectaron utilizando los plásmidos RQ (vector vacío) y K3 (siRNA dirigido contra CBF β) [Anexo1]. La transfección se hizo con lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

La selección de las células transfectadas se realizó con puomicina ($1 \mu\text{g/ml}$) por 1 semana.

6. Extracción de ARN total y Retrotranscripción (RT)

La extracción del ARN total de las células se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, se retiró el medio a las células y se añadió el trizol homogenizando la muestra, el material genético se separó usando cloroformo, se tomó la fase acuosa y el ARN se aisló empleando isopropanol, y finalmente el botón se resuspendió en agua libre de RNAsas. El ARN se cuantificó y se determinó su pureza con la relación 260/280. La integridad se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con Syber green. La RT (retrotranscripción) se realizó con los ARNs de las líneas celulares RQ y K3 con el kit SuperScript VILO MasterMIX (Invitrogen), técnica basada en la acción de la enzima transcriptasa reversa III, reacción que se llevo a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) las muestras se mantuvieron a 25°C durante 10 min y 42°C por 30 min y se detuvo a los 85°C, finalmente las muestras fueron almacenadas a -70°C para su uso posterior.

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En esta técnica el ADNc es amplificado exponencialmente por medio de ciclos de desnaturalización, alineación y extensión. Los componentes de la PCR, además del ADNc incluyen dNTPs, buffer, enzima polimerasa ADN termoestable y primers específicos para el gen de interés que fueron los siguientes:

Primer para CBF β -sentido

5'- CCG ACC AGA GAA GCA AGT TC-3'

Primer para CBF β anti-sentido

5'- GAA TCA TGG GAG CCT TCA AA-3'

La expresión del ARN mensajero se normalizó con la expresión del gen constitutivo Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), empleando los siguientes primers:

Primer para GAPDH sentido

5'- CCCCTTCATTGACCTCAACT-3'

Primer para GAPDH anti-sentido
5'- TTGTCATGGATGACCTTGGC-3'

El proceso se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR system9700 (Applied Boystems) con las siguientes condiciones:

Para obtener las unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas se realizó un análisis densitométrico. Las bandas se normalizaron de acuerdo a la intensidad de la expresión de GAPDH.

95°	95°	52.8°	72°	72°	4°
10'	30'	30'	30'	5'	---

8. Proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular nos permiten observar si existe alguna diferencia en cuanto a la capacidad proliferativa que tienen las células, es decir, si el incremento del número celular varía de las células que contienen el siRNA en contraste con las que no lo contienen.

Para ello brevemente, las líneas celulares RQ y K3 se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos, a una densidad de 2000 células por pozo y se fijaron con etanol al 70% cada 48 hrs. durante 8 días. Los resultados finales se obtuvieron de igual forma mediante la técnica de cristal violeta, y se cuantificaron en el lector DTX 880 multimode detector (Beckman Coulter). Se realizaron 3 ensayos independientes.

9. Formación de esferoides

El interés por llevar a cabo este experimento recae en demostrar, si existen diferencias dentro de nuestras dos poblaciones celulares en cuanto a la capacidad de formar estas estructuras tridimensionales, que conllevan a numerosas interacciones que en un cultivo en monocapa no son posibles de percibir. Para tal fin, se sembraron 1×10^6 células en botellas de 50 ml, 25 cm^2 para cultivos en suspensión, durante una semana, posteriormente se pusieron en una incubadora rotatoria MaxQ 4000

(Thermo scientific) a 37°C con medio Leibovitz L-15. El medio se cambió cada dos días y los esferoides malformados se eliminaron en el experimento se monitoreo tanto la capacidad de formación de esferoides como el crecimiento de éstos en ambas poblaciones [basado en la técnica “liquid overlay” (Anexo 2 y 4)].

10. Crecimiento sobre agar suave

En este ensayo se evaluó la capacidad clonogénica independiente de anclaje de ambas poblaciones celulares (RQ y K3), para lo cual se empleó una placa de 6 con una base de una solución formada por agar bajo punto de fusión 1% más DMEM 2X, se dejó reposar durante un día y sobre la base ya solidificada se sembraron 2,000 células en cada pozo, contenidas en una mezcla de agar bajo punto de fusión 1% más DMEM 2X suplementado al 10% con SFB, posteriormente se incubaron durante 15 min a 4°C para que gelificara la solución, para evitar su desecamiento se agregaron 500µl de DMEM 1X 10%SFB a cada pozo, este medio se monitoreo constantemente de tal forma que tuvieran el suficiente durante el transcurso del ensayo, finalmente se dejaron en una incubadora a 37°C con una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v) durante 15 días. Para obtener los resultados, se retiró el medio y se tiñeron durante una hora con cristal violeta a una concentración de 0.005, y se midió la absorbancia a 570nm.

Resultados

Los últimos estudios acerca de CBF β así como de sus proteínas asociadas RUNX, han demostrado que existe una relación entre la disminución de su expresión y la progresión tumoral [77, 78]. No obstante el papel que juega CBF β no ha sido elucidado aún, y en un esfuerzo por examinar la contribución de CBF β sobre el fenotipo maligno, se decidió llevar a cabo la inhibición de este factor de transcripción en la línea celular MCF-7, para observar las diferencias existentes sobre procesos asociados a la tumorigénesis. Para ello, se inhibió a CBF β usando un siRNA específico contra su ARNm y como control se tomaron células transfectadas con un siRNA no específico.

Inhibición de CBF β

Para realizar la inhibición de CBF β , se transfectó en células MCF-7, un ARNi dirigido contra CBF β . Las líneas estables se denominaron RQ (células MCF7 Control) y K3 (células con el siRNA/CBF β). Para determinar la eficiencia del siRNA/CBF β , se observó la actividad transcripcional del gen que codifica para este factor mediante RT-PCR, tomando como control la expresión del gen constitutivo gliceraldehído-3fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se puede observar claramente la inhibición de la expresión de CBF β en contraste con el control (Fig. 5).

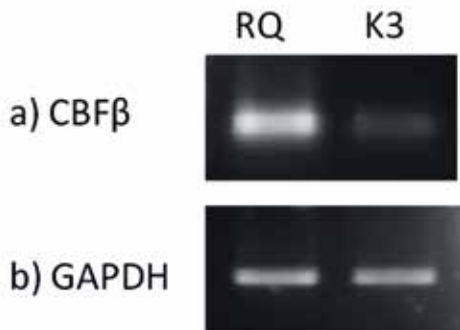


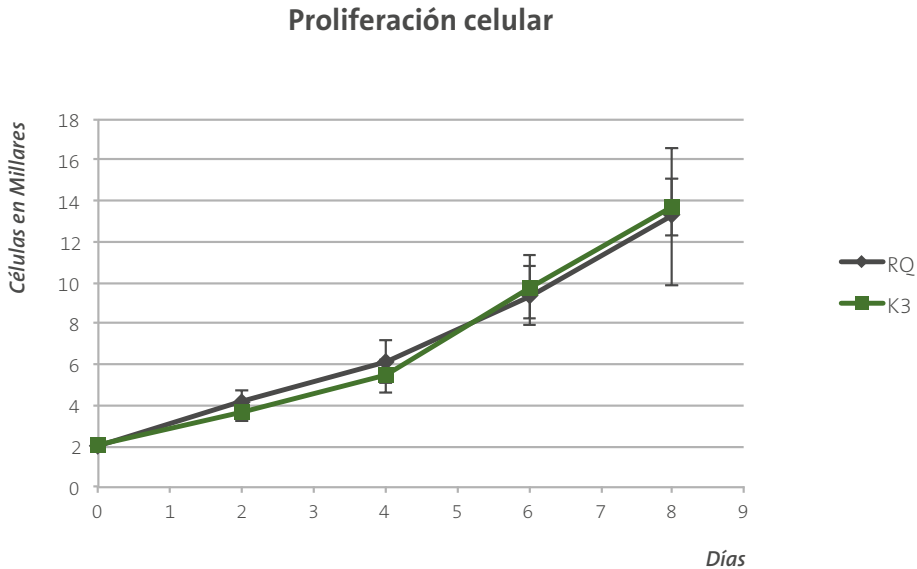
Fig.5 Expresión de CBF β en las líneas RQ y K3. La inhibición de CBF β con el siRNA se comprobó mediante RT-PCR. a) Bandas correspondientes al ARNm de CBF β en las líneas RQ y K3 b) ARNm del gen constitutivo GAPDH para las líneas. Este experimento se realizó por triplicado.

Dentro del laboratorio se hizo un estudio analizando mutaciones y translocaciones a lo largo de la secuencia de células de cáncer de mama, a partir de biopsias obtenidas de pacientes, en donde más del 80% de las muestras se encontraban en estadios avanzados II y III y los resultados obtenidos mostraron que CBF β se encontraba

mutado. Además se hizo un análisis similar pero para muestras de CaCU en donde CBF β también se encontró mutado. Lo anterior indica que CBF β se encuentra regulando la tumorigénesis, por lo que decidimos analizar cómo afectaba la inhibición de CBF β en algunos procesos tumorales.

Proliferación celular

Uno de los procesos que se ven afectados en las células tumorales, es la proliferación. Las células tumorales tienen la característica de proliferar a un ritmo acelerado debido a la desregulación de las vías que mantienen este proceso celular. Por lo que analizamos este proceso en la línea con CBF β inhibido. Como se muestra en la gráfica siguiente (Gráfica 1), no hubo diferencias al comparar las líneas RQ y K3 en un periodo de tiempo corto.

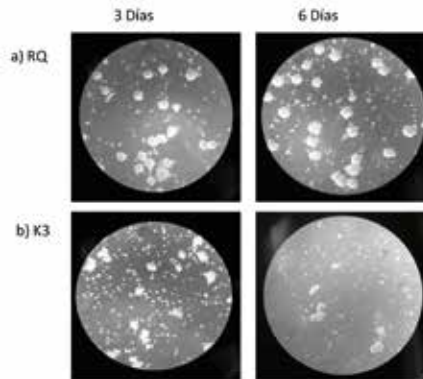


Gráfica 1. La inhibición de CBF β no afecta la proliferación celular. Se sembraron células K3 y RQ y se mantuvieron por 8 días. Se tiñeron por el método de cristal violeta y se leyó la absorbancia 570nm. El ensayo se realizó por triplicado.

Formación de esferoides

El cultivo de los esferoides tumorales multicelulares (MTS) ha cobrado relevancia en los últimos años como modelo in vitro de los tumores sólidos. La estructura general de los MTS mimetiza las etapas iniciales de los microtumores sólidos in vivo antes de la vascularización, y por ello en los últimos años han sido utilizados en el estudio de la biología tumoral [95]. La capacidad que adquieren las células para formar tumores es otro proceso involucrado en la tumorigénesis. Por lo anterior, evaluamos la capacidad que poseen las líneas celulares RQ y K3 para la formación y mantenimiento de MTS. Los resultados arrojaron que CBF β está involucrado en este proceso, pues su ausencia inhibió en gran medida la capacidad para formar esferoides (Fig. 6), pues aunque en los primeros días de cultivo se observaron algunos conglomerados celulares estos se desintegraron casi por completo después de los 6 días, a diferencia del grupo control, en donde este fenotipo fue muy evidente al formar esferoides bien delimitados y que al paso del tiempo continuaron creciendo.

Fig.6 CBF β regula la capacidad de formar esferoides. Las células RQ y K3 fueron cultivadas por la técnica “liquid overlay” durante una semana. a) Formación de esferoides por parte de línea RQ a los 3 y 6 días de cultivo. b) Formación de esferoides de la línea celular K3 a los 3 y 6 días de cultivo. Fotografías tomadas a un aumento 10x. El ensayo se hizo por triplicado.



Crecimiento sobre agar suave

Ya que CBF- β mostró estar implicado en la formación de esferoides tumorales, se continuó con el ensayo de formación de colonias sobre agar suave, que es un

ensayo *in vitro* para monitorear el crecimiento independiente de anclaje; es considerado el ensayo más preciso y riguroso para detectar la transformación maligna de las células.

El crecimiento de colonias celulares independientes de anclaje se vio afectado por la inhibición de CBF β , pues el crecimiento de las colonias K3 se mostró disminuido en gran medida y no formaron esferoides, en comparación con el grupo control (Fig.7).

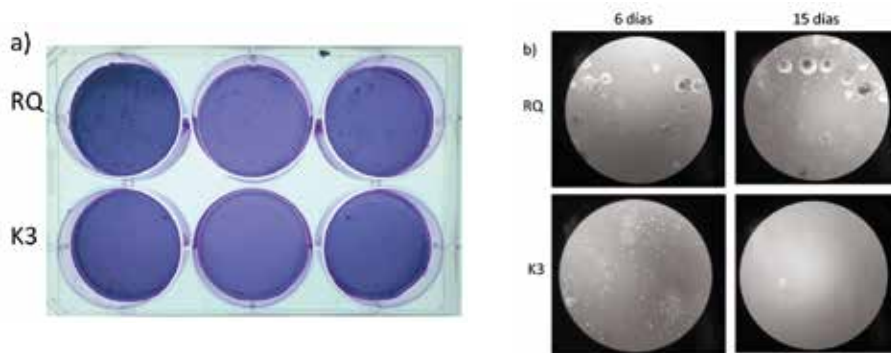


Fig.7 La inhibición de CBF β disminuye la capacidad de crecimiento independiente de anclaje. a) Ensayo de crecimiento sobre agar suave para las líneas celulares RQ y K3 b) Formación de colonias independiente de anclaje de las líneas RQ y K3 (fotografías tomadas a un aumento 10x).

Discusión

El cáncer es una patología de gran relevancia a nivel mundial debido a su alto índice de mortalidad, así como por su complejo origen y comportamiento biológico. Este grupo de enfermedades se caracteriza por una proliferación descontrolada de las células, que tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes. Este fenotipo es producto de un conjunto de mutaciones al ADN en respuesta a la interacción de factores físicos, químicos y biológicos.

CBF β forma parte de un complejo factor de transcripción, que regula la expresión de muchos genes blanco involucrados en procesos como la hematopoyesis, la osteogénesis, entre otros [53]. CBF β se ha encontrado mutado en diferentes tipos de cáncer, relacionándolo con el desarrollo tumoral [77,78]. Recientemente, en pacientes mexicanas, se reportaron mutaciones significativas de este gen, en cáncer de

mama y en cáncer cervicouterino [80,81]. Hasta el momento no se conoce el papel que este gen está teniendo en el proceso carcinogénico, por lo que resulta de gran importancia esclarecer su actividad pues es un blanco terapéutico muy atractivo para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

En este proyecto, decidimos analizar la contribución de CBF β al fenotipo maligno en células MCF-7 de cáncer de mama. Utilizamos un RNA de interferencia dirigido contra CBF β y analizamos algunos de los procesos involucrados en la carcinogénesis; proliferación, formación de esferoides y crecimiento independiente de anclaje.

Por medio de RT-PCR verificamos la eficiencia del RNAi dirigido contra CBF β en la línea celular MCF7, obteniendo una inhibición eficiente.

Al comparar las líneas celulares (control y con CBF β inhibido) en el proceso de proliferación celular, no encontramos diferencias. Hasta la fecha, solamente se ha reportado que cuando CBF β se encuentra fusionado con otras proteínas, hay un cambio en el comportamiento celular [91,92]. El grupo de Mandoli (2013) mostró que la fusión de CBF β -MYH11 en AML, actúa como activador y represor de varios genes involucrados en la diferenciación y la adhesión celular; además, de inducir la proliferación de células tumorales [92]. El grupo de Zhao (2014) demostró que la fusión de RUNX1/CBF β /MLL en AML, provocaba la disminución de la expresión de RUNX1 y de CBF β y al mismo tiempo potenciaba la proliferación y la diferenciación celular [91]. En base a lo anterior, podemos decir que la relación entre la expresión de CBF β y la regulación de la proliferación, es debido a los genes con los cuales CBF β interactúa y no como consecuencia de una característica intrínseca de CBF β , por lo cual no se observaron diferencias entre las poblaciones celulares.

En el 2010, Davis J.N y colaboradores, publicaron que al inhibir CBF β en células de cáncer de próstata e inyectarlas de forma subcutánea en ratones SCID/bei-gemice machos, el crecimiento tumoral se inhibió en comparación con el grupo control. Para corroborar sus resultados hicieron lo mismo con células de cáncer de ovario SKOV-3 en las que también inhibieron a CBF β y las inyectaron intraperitonealmente en ratones hembras. En ambos casos los tumores de los ratones con CBF β inhibido eran de menor tamaño y peso, en comparación con los grupos control [102]. En este proyecto, no realizamos experimentos in vivo, pero analiza-

mos la inhibición de CBF β en la formación de esferoides. Este tipo de cultivo, son agregados de células cancerosas y han sido utilizados por la investigación biomédica, debido a que mimetizan de una manera más fidedigna la condición in vivo de los tumores verdaderos, que el cultivo en monocapa (Sutherland y cols., 1971). En este proyecto, la formación de esferoides tuvo un resultado similar a los experimentos in vivo, previamente reportados. La línea celular RNAi/CBF β , no tuvo la capacidad para formar esferoides en contraste con el control, lo que quiere decir que la presencia de CBF β es esencial para este proceso. Por último, evaluamos la inhibición de CBF β sobre el crecimiento independiente de anclaje. Este experimento fue elegido pues evalúa la capacidad que tienen las células para proliferar en ausencia de adhesión a la matriz extracelular (ECM), característica muy particular de la tumorigenicidad en modelos animales [101]. Nuestros resultados demostraron que CBF β se encuentra implicado en esta capacidad, pues su inhibición disminuyó drásticamente la proliferación independiente de anclaje en comparación con el control. Davis J.N y su grupo, obtuvieron resultados similares en este ensayo al inhibir a CBF β en células PPCI y PC-3 de cáncer de próstata y células SKOV-3 de cáncer ovárico, en donde los cultivos redujeron altamente su eficiencia en el crecimiento independiente del anclaje e incluso mostraron un crecimiento independiente de anclaje CBF β dosis-dependiente [102]. En conjunto, se podría concluir que la presencia de CBF β es necesaria para que las células proliferen sin ECM.

En resumen, CBF β favorece la formación de esferoides y el crecimiento independiente del anclaje en la línea celular MCF7 de cáncer de mama.

De acuerdo a los estudios previos [77,78,79,80], se deduce que CBF β es un gen supresor de tumores, pues al mutar y disminuir su expresión, permite la progresión tumoral, sin embargo, mis resultados y respaldados por los estudios de Davis J.N 2010 [102], mostraron que la disminución de la expresión de CBF β en células tumorales inhibe la capacidad que tienen para formar esferoides tumorales, así como para crecer independientes de anclaje. Sabemos que estas características son esenciales en el fenotipo tumoral, lo cual podría crear una contradicción en cuanto a la función que CBF β está teniendo dentro de los procesos asociados a la tumorigenicidad, por lo cual, cabe mencionar que este tipo de dualidad no es algo nuevo dentro del campo del cáncer, pues ya se conocen genes con este tipo de características, que son primordiales en la tumorigénesis [106]. Además, la familia

de proteínas RUNX con las que CBF β interactúa directamente, es conocida ya, por representar una excepción a la clasificación bilateral tradicional de los genes que regulan los procesos carcinogénicos [107]. Por ello resulta de gran importancia el continuar con estos estudios, pues CBF β mostró ser un gen muy interesante dentro de la biología tumoral.

Conclusiones

- El ARNi/CBF β se transfectó exitosamente y se logró disminuir la expresión del RNAm de CBF β .
- No se mostraron diferencias en cuanto a la proliferación celular para la línea celular MCF-7
- CBF β estimula la capacidad que tienen las células en la formación de esferoides tumorales en células MCF-7.
- CBF β influye positivamente en el crecimiento celular independiente de anclaje en células MCF-7.

Con base a los resultados obtenidos, concluimos que CBF β participa con la capacidad que tienen las células cancerosas tanto para formar tumores así como para crecer independientemente del anclaje, pues la inhibición de CBF β impidió que estos dos procesos se llevaran a cabo y teniendo en cuenta que ambos son muy importantes en el desarrollo tumoral, se resalta la importancia de continuar con su estudio, pues estas evidencias lo convierten en un atractivo blanco terapéutico.

ANEXOS

Anexo 1. ARNi (ARN de interferencia)

En 1998, Fire y Mello establecieron que los ARN de doble cadena (por sus siglas en inglés dsRNA), eran responsables del silenciamiento en *Caenorhabditis elegans*. Sus experimentos revelaron el contemporáneo silenciamiento post-traduccional, mediante el apareamiento de bases de un ARN antisentido con su respectivo ARNm, previniendo su traducción a proteína [89]

La interferencia a partir de ARNs, es un fenómeno que permite el silenciamiento de genes de manera post-traduccional por sus siglas en inglés PTGS, después de la producción endógena o la inserción artificial de ARNs pequeños de de doble cadena de aproximadamente 20-25 nucleótidos (nt), que interfieren con el ARNm del gen blanco [82]. En *C.elegans* esta capacidad de silenciamiento es hereditaria, pues una vez que se introduce un dsRNA específico, este es transmitido a su progenie [89].

Este mecanismo fue estudiado a fondo tanto en plantas (*Arabidopsis thaliana*) como animales (*Caenorhabditis elegans*) y se identificó inicialmente como un mecanismo de defensa contra ADN y ARN extraño, pero actualmente es muy claro que el RNAi es ampliamente usado en muchas, si no es que en todas las células eucariotas, como un mecanismo regulador de la expresión génica [83].

Los siRNAs pueden ser clasificados de acuerdo a las proteínas que están involucradas en su biogénesis, su modo de regulación o su tamaño, pero principalmente por su origen pues estos pueden ser producidos de manera endógena o ser exógenos es decir, transfectados artificialmente [83].

El mecanismo del ARN de interferencia, consiste en que un ARN largo de doble cadena (dsRNA) es cortado en dos partes por una enzima llamada Dicer, que es una RNA-asa que pertenece a la familia III de ribonucleasas, con ello, se obtiene un par de siRNAs que comprenden dos cadenas de 21nt, las cuales inician en el fosfato del extremo 5' terminando en el grupo hidroxilo 3' pero peculiarmente apareadas de tal manera que dejan libres dos nucleótidos en el extremo 3'[75,85,86]. La cadena que silenciará directamente es llamada guía, mientras que la otra cadena la cual es ubiquitinizada y degradada es conocida como pasajera. La regulación mediante siRNAs es mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN,

por sus siglas RISC, nombre genérico que se le da al complejo formado entre el siRNA y la proteína efectora Argonauta (AGO) [87,88].

Este descubrimiento se ha convertido en una poderosa arma tanto en ingeniería genética como en genética funcional, y en especial el proceso PTGS es muy útil para el estudio de la función de proteínas individuales o de un grupo de estas. Los constructos destinados para realizar el fenómeno ARNi, son diseñados para expresar una secuencia homóloga al ARNm del gen blanco en forma de un RNA hairpin (hprNA), el cual se caracteriza por la inserción de una secuencia (usualmente un intrón) en forma de horquilla entre las dos secuencias complementarias, que potencia la eficiencia del siRNA [89,90] (Fig. 8)

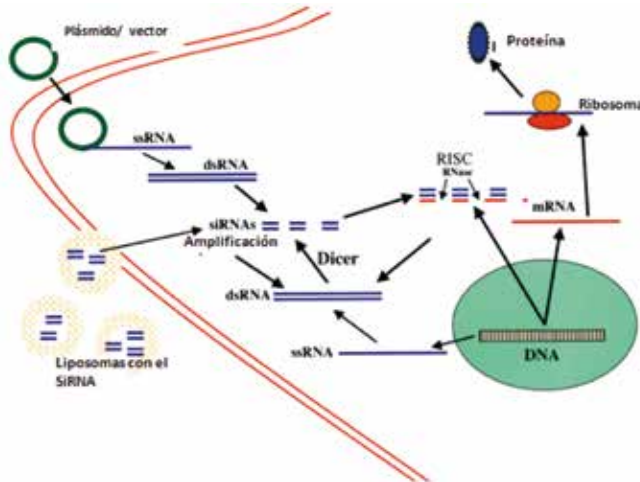


Fig.8 Rutas de los ARNi. El silenciamiento mediado por ARNi, puede ser inducido experimentalmente mediante la introducción de siRNAs sintéticos a la célula, empleando varios métodos de transfección como liposomas o vectores virales que expresen dsRNAs contra un gen en específico. Una vez introducido, el dsRNA será cortado por una proteína llamada Dicer para originar siRNAs pequeños de 21-23 nucleótidos (azul), los cuales se asociaran con su ARNm blanco (rojo) y formaran un complejo proteínico llamado RISC, el cual tiene actividad de ARNasa que degrada el ARNm en cuestión, y de esta forma la síntesis de la proteína es prevenida. (Milhavet O, Gary DV, et al. 2003)

Anexo 2. Esferoides

A diferencia de los tradicionales cultivos celulares en monocapa, la estructura tridimensional nativa de los carcinomas gobierna numerosas interacciones autócrinas y parácrinas relacionadas a la progresión del tumor; este problema se ha resuelto, en parte, con el uso de nuevos modelos en cultivo denominados esferoides tumorales multicelulares (MTS) que semejan la intrincada y compleja red tridimensional con interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (uniones comunicantes, desmosomas y E-cadherina, principalmente), por lo que cada célula está expuesta a diferentes condiciones de espacio y disponibilidad de nutrientes.

De acuerdo a su origen, existen dos tipos de esferoides tumorales. Los MTS clonogénicos y los MTS agregados. Los del primer tipo provienen de una célula tumoral o un pequeño explante de tejido cultivadas, en una primera fase, en recipientes que contienen una superficie antiadherente y estática, lo que permite la creación de un núcleo primario. Después los esferoides son sometidos a una segunda fase de agitación orbital suave (40 a 50 rpm) que favorece la consolidación de los MTS.

Anexo 3. Curva de puromicina (resultados)

Con la línea MCF7 se determinó la dosis adecuada para la selección de las líneas estables. En la figura 6, se muestran las fotografías de las células expuestas a diferentes dosis de puromicina a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En los incisos a y b, se puede observar que aún quedan células viables, mientras que en c, todas las células están muertas, por lo que esta dosis fue la que se utilizó para la selección (Fig.9).

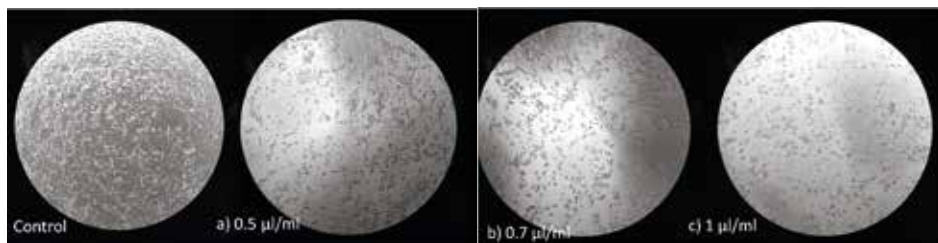


Fig.9 Rutas de los ARNi. El silenciamiento mediado por ARNi, puede ser inducido experimentalmente mediante la introducción de siRNAs sintéticos a la célula, empleando varios métodos de transfección como liposomas o vectores virales que expresen dsRNAs contra un gen en específico. Una vez introducido, el dsRNA será cortado por una proteína llamada Dicer para originar siRNAs pequeños de 21-23 nucleótidos (azul), los cuales se asociaran con su ARNm blanco (rojo) y formaran un complejo proteínico llamado RISC, el cual tiene actividad de ARNasa que degrada el ARNm en cuestión, y de esta forma la síntesis de la proteína es prevenida. (Milhavet O, Gary DV, et al. 2003)

Anexo 4. Técnica Liquid Overlay

Ambas líneas celulares RQ y K3 fueron cultivadas usando la técnica Liquid Overlay como la describió Yuhas et al [105]. Brevemente, las células se sembraron en monocapa en cajas petri con una base de agarosa al 2% por una semana, y después se pasaron a una incubadora rotatoria en medio Leibovitz L-15 a 37° C. El medio fue reemplazado cada dos días y los esferoides malformados fueron eliminados.

Bibliografía

1. Barruti S. (2010). Breve historia del cáncer, rescatado el 5 de Diciembre del 2014: http://www.intramed.net/buscar_resultado.asp
2. INEGI. Estadísticas a propósito de día mundial contra el cáncer (4 de Febrero 2014) datos nacionales. Rescatado el 5 de diciembre 2014 de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
3. Sin autor. (2014). What is cancer?, National Cancer Institute, rescatado el 10 de Diciembre de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
4. Cavenee, Webster K. White Raymond. (1995). Bases Genéticas del Cáncer. L. investigación y ciencia, 224. Rescatado el 10 de Diciembre del 2014: <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/numeros/1995/5/bases-genticas-del-cncer-6777>
5. Hanahan D, Weinberg R. (2011). Review: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 ; 646-74.
6. Radman Miroslav, et al. (1988). Fidelidad de la duplicación del ADN.” *Invest. y Ciencia*, 145; 20-30.
7. García GV., González-Moles MA, Bascones MA.(2005). “Bases moleculares del cáncer oral”, Revisión bibliográfica. *Av Odontostomatol [online]* vol.21, n.6; 287-295. ISSN 0213-1285. Rescatado el 10 de Diciembre 2014 de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-12852005000600002&script=sci_arttext
8. Beltrán Ortega A. (2013). Cáncer de mama, primera edición, México: Trillas
9. Leon, J. et al. (1998). Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Invest. y Ciencia*, 143; 20-34.

10. Alberts et al. (2008). *Molecular Biology of the cell*, 5TH Edition, Garland Science, capítulo 20: Cáncer; 1230-1256.
11. Kumar V., et al. (2005). *Pathologic Basis of Disease*, 7th ed, Elsevier/Saunders, capítulo 7: Oncogenes and tumor suppressor Genes; 292-306
12. Laird P. (1997). Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Molecular Medicine Today*; 223-229.
13. Doll R, Hill AB. (1954). The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. *BMJ* 228; 1451–1455.
14. Armitage P, Doll R. (1957). A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br J Cancer* 11: 161–169
15. Day NE, Brown CC. (1980). Multistage models and primary prevention of cancer. *J Natl Cancer Inst* 64: 977–989
16. Stenback F, Peto R, Shubik P. (1981). Initiation and promotion at different ages and doses in 2200 mice. I. Methods, and the apparent persistence of initiated cells. *Br J Cancer* 44: 1–14
17. Civetta M, Civetta D. (2011). Carcinogénesis, Departamento de Oncología, Hospital Dr JR Vidal, *Salud Pública Mex*, 53(5); 405-414
18. Weinberg A. (2007). *The biology of cancer*. 1ra edición, Garland science, Tylor and Francis group LLC; 25-56
19. Pirog, Edyta C. et al. (2000). Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Different Histological Subtypes of Cervical Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology* ,157;1055 – 1062
20. Teramoto et al. (1996). Epstein-Barr Virus Infección in the Neoplastic and Nonneoplastic Cells of Lymphoid Malignancies. *Cancer*, 77 (11); 2339-2347

21. Massagué J.(2009). Evolución y metastasis del cáncer. SSEBM 160 [online]. Rescatado 3 de Enero 2015 de: <http://www.sebbm.com/pdf/160/d05160.pdf>
22. Colville P, et al. (1997). Growth Factors in Angiogenesis: Current interest and therapeutic potential. *Molecular Medicine Today*;14-23.
23. Masakazu T et al. (1996). Quantitative Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor in Primary Breast Cancer. *Cancer*, 77 (6); 1101-1106
24. Halachmi S et al. (1994). Estrogen Receptor Associated Proteins: Possible Mediators of Hormone Induced Transcription. *Science*, 264; 1455-1458.
25. Khan S et al. (1994). Estrogen Receptor Expression of Benign Breast Epithelium and Its Association with Breast Cancer. *Cancer Research*, 54; 993-997
26. Massagué J. (2008). TGF β in Cancer” Review. Cancer biology and genetics program, and Howard Hughes Medical Institute. Memorial Sloan-Kettering Cancer center, New York; NY. *Cell*, 134; 2015-2030.
27. Loeb LA., Cheng KC. (1990). Errors in DNA synthesis: a source of spontaneous mutations. *Mutant Res* 238; 297–304.
28. Yuspa SH., Poirier MC.(1988). Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res* 50; 25–70.
29. Lengauer C., Kinzler KW., Vogelstein B.(1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396; 643–9.
30. Sidransky D. (1983). Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 7, 1995;229–33
31. Bishop JM. (1983). Rev. Cancer genes come of age. *Cell* 32; 1018-20
32. Ledford H. (2015). Cáncer: The Ras renaissance. *Nature*, 520; 278-280

33. Alberts et al.(2008). Molecular Biology of the cell; 5TH Edition, Garland Science, capítulo 20; Cancer; 1333-1338
34. Lemmon M.A., Schlessinger J. (2008). Cell signaling by receptor tyrosine Kinases. *Cell* 141; 1117-1134
35. Cheng N., et al.(2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Cancer Research* 6; 1521-1533
36. Collado M, Serrano M.(2010). Senescence in tumors: evidence from mice and humans. *Nature Rev. Cancer* 10; 51-57
37. Evan G.I, d'Adda di Fagagna F. (2009). Celular senescence: hot or what?. *Curr. Opin. Genet.Dev.*19; 25-31
38. Philipot O., et al. (2010). The core binding factor CBF negatively regulates skeletal muscle terminal differentiation. Imhof A. ed. *Plos One* 5(2); e9425
39. Adams J., Cory S.(2007).The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26; 1324-1337
40. Luna L.A., et al. (2008). El fantástico mundo de la proteína Bcl-2. *Revista de educación Bioquímica, UNAM*, 27(3); 93-102
41. Blasco MA.(2005).Telomeres and human disease: ageing, cáncer and beyond. *Nature rev. genet.* 6; 611-622
42. Hanahan D., Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86; 353-364
43. Ferrara N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21; 21-26

44. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z.(2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141; 52-67
45. Baeriswyl V., Christofori G. (2009).The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*19; 329-337
46. Kazerounian S., Yee KO., Lawler J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 65; 700-712
47. Nagy JA., et al. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 36; 321-331
48. Berx G., Roy F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* 1.
49. Cavallaro U., Christofori G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature rev. cancer* 4; 118-132
50. Adya N., Castilla LH., Liu PP. (2000). Function of CBF β /Bro proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 11; 361-368
51. Speck NA., Terry S. (1995). A new transcription factor family associated with human leukemias. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 5; 337-364
52. Amati P. (1992). Mutations in the VP1 Coding Region of Polyomavirus determine differentiating stage specificity. *Journal of virology*, 66 (12); 7153-7158
53. Okuda T., et al. (1996). AML1 the target of multiple chromosomal translocations un human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84; 321-330
54. Komori T., et al.(1997).Targeted disruption of Cbf β 1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89; 755-764

55. Levanon D., et al. (2002). The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The journal Embo*, 21(13); 3454-3463
56. Li QL., et al. (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109(1); 113-124
57. Yoshiaki Ito. (2004). Oncogenic potential of the RUNX gene family: Overview. *Nature* 23; 4198-4208
58. Kania M., et al. (1990). The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev.* 4; 1701-1713
59. Miyoshi H., et al. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1(88)
60. Liu P, et al. (1993). Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 261;1041-1044
61. Cameron ER., Neil JC. (2004). The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Nature* 23; 4308-4314
62. Levanon D. et al. (1996). A large variety of alternatively spliced and differentially expressed mRNAs are encoded by the human acute myeloid leukemia gene AML1. *DNA cell Biol.* 15(3);175-185
63. Downing JR., et al. (2000). Alterations of the AML1 transcription factor in human leukemia. *Semin Cell Dev Biol.* 11(5); 347-360
64. Canon J, Banerjee U. (2000). Runt and Lozenge function in Drosophila development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11(5); 327-336

65. Golub TR., et al.(1995).Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92 (11); 4917-4921
66. Goyama S., et al. (2013). Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *The Journal of chemical investigation*; 123 (9), 3876-3888.
67. Cameon ER., et al (2003). The RUNX genes as dominant oncogenes. *Blood cells mol dis* 30 (2); 194-200
68. Strom DK.,et al. (2000). Expression of the AML-1 oncogene shortens the G(1) phase of the cell cycle. *J Biol Chem* 275(5); 3438-3445
69. Yergeau DA, et al. (1997). Embryonic lethality and impairment of hematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet*. 15(3); 303-306
70. Ogawa E., et al. (1993). Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology*, 194 (1); 314-331
71. Komori T., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturation arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5); 755-764
72. Otto F, et al.(1997). Cbfa, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*,89(5); 765-771
73. Ducy P, et al. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5); 747-754
74. Mundlos S., et al.(1991). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5); 773-779

75. Lee B., et al. (1997). Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF/CBFA1 in claidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16; 307-310
76. Stewart M., et al. (1993). Conditional expression and oncogenicity of c-myc linked to a CD2 gene dominant control region. *Int J Cancer* 53 (6); 1023-1030
77. Miyagawa., et al. (2006). Down-regulation of RUNX1, RUNX3 and CBF β in hepatocellular carcinomas in an early stage of hepatocarcinogenesis. *Anticancer research*, 26; 3633-3643
78. Sakakura C., et al. (2005). Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor CBF β in gastric cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* ,113; 221-228
79. Ellis, M.J., et al. (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, 486; 353-360
80. Banerji S., et al. (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486, (405-409).
81. Ojesina AI., et al. (2014). Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*, 506 (371-375).
82. Boshier JM., Labousse M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2; E31-E36
83. Ghildiyal M., Zamore DP.(2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature*, 10; 94-108
84. Zamore P. D., et. al. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATPdependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101; 25-33

85. Elbashir S. M., Lendeckel W. & Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15; 188–200
86. Elbashi SM., et. al. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20; 6877–6888
87. Hammond SM. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404; 293–296
88. Liu J. et al. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biol.* 7 ; 1161–1166
89. Fire A. et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 ; 806–811
90. Grishok A., Tabara H. & Mello CC. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, 287; 2494–2497
91. Zhao X., et al. (2014). Downregulation of RUNX1/CBFB by MLL fusion proteins enhances hematopoietic stem cell self-renewal. *Blood* 123(11); 1729-1738
92. Mandoli A., et al. (2014). CBFB-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia. *Nature Leukemia*, 28; 770-778
93. Zhang Y., Chen A., Yan XM., Huang G. (2012). Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia2. *Int J Hematol*, 96(4); 428-437
94. Meyer C., Hoftman J., Burmesiter T., et al. (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*, 27(11); 2165-2176
95. Gallardo P.J.C, Espinosa C.M., Zagla M.J., Lagunas M.V., (2006). Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéu-

- ticas anticancerosas. *Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) REB*, 25(4); 101-107
96. Ichikawa M., et al. (2004). Runx/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle*, 3(6); 722-724
97. Tang YY., et al.(2000). Energetic and functional contribution of residues in the core binding factor beta (CBFbeta) subunit to heterodimerization with CBFalpha. *J Biol Chem*. 275(50); 39579-39588
98. Okuda T., et al. (1996). AML1, target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84(2); 321-330
99. Wang Q., et al. (1996).The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML 1) function in vivo. *Cell*, 87(4); 697-708
100. Wotton S., et al.(2008). Gene array analysis reveals a common Runx transcriptional program controlling cell adhesion and survival. *Europe PMC Funders Group*, 27(44); 5856-5866
101. Cifone MA. (1982). In vitro growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells. *Cancer metastasis Rev*. 1; 335-347
102. Davis NJ., et al. (2010). Association of Core-Binding Factor β with the malignant phenotype of prostate and ovarian cancer cells. *Cellular Physiology Journal*; 875-887
103. Pavel B., Curik N., Stopka T. (2009). PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and CBF β during Leukemia differentiation. NIH Public access, *Mol Cancer Res*. 7(10); 1693-1703
104. Novak JF, Tronka F. (2005). Proenzyme therapy of cancer. *Anti-cancer Res*. 25; 1157-1177

-
105. Carlsson J., Yuhas JM. (1984). Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Cancer Res.* 95; 1-23
 106. Massagué J. (2008) TGF β in Cancer. *Cell*,134; 215-230
 107. Cameron RE, Neil CJ. (2004) The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors *Oncogene*, 23; 4308-4314

