



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas
Centro de Investigación en Dinámica Celular

**“Inhibición de la actividad de TOP2a y su efecto en la expresión
de dos genes asociados con metástasis en la línea celular de
CaMa, SKBR3 tratadas por paclitaxel”**

Tesis

Para obtener el grado de:
Licenciado en Ciencias área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

Luz Elena Villarreal Miranda

Generación 2018-2022

Director de tesis:

Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Cuernavaca, Morelos, México.

Mayo 2023

Índice General

1. MARCO TEORICO	5
1.1. Cáncer	5
1.1.1. Cáncer de mama	6
1.1.2. Epidemiología de CaMa	7
1.2. Glándula mamaria y CaMa	8
1.3. Estadios del CaMa	8
2.4 Metástasis	9
1.5 Clasificación histopatológica del CaMa	14
1.5.1. Receptores hormonales (RE y RP)	15
1.5.2 Triple negativo (TN)	15
1.5.3 Receptor 2 del factor de crecimiento Epidermal (HER2)	15
1.5.4 Amplicón HER2	16
1.5.5 Topoisomerasas	17
1.6 Tratamiento de primera y segunda línea para tumores HER2+	20
1.6.1. Quimioterapia	20
1.6.2. Paclitaxel	21
1.6.3 Resveratrol (RSV)	21
1.7 Antecedentes específicos	22
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. MAPA CONCEPTUAL	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVO	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos específicos	24
7. METODOLOGÍA	24
8. RESULTADOS	26
8.1 La inhibición de la actividad de TOP2 α y el tratamiento con Paclitaxel disminuyen la viabilidad de la línea celular SKBR3	26
8.2 Análisis de la expresión de genes que participan en la regulación de la metástasis en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel.	28
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIÓN	35
11. PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. HALLMARKS DEL CÁNCER. MODIFICADO DE “HALLMARKS OF CANCER: NEW DIMENSIONS”, 2022.	6
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LOS 10 TIPOS DE CÁNCER MÁS COMUNES EN 2020 PARA AMBOS SEXOS. MODIFICADO DE “GLOBAL CANCER STATISTICS 2020: GLOBOCAN ESTIMATES OF INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE FOR 36 CANCERS IN 185 COUNTRIES“, 2021. ...	7
FIGURA 3. CASCADA METASTÁSICA. DESCRIPCION GENERAL DE LOS 3 PRINCIPALES PROCESOS DE LA METÁSTASIS QUE INCLUYEN LA INVASION, INTRAVASACIÓN Y EXTRAVASACIÓN. MODIFICADO DE MOLECULAR PRINCIPLES OF METASTASIS: A HALLMARK OF CANCER REVISITED, 2020.	10
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (EMT). LAS CÉLULAS TUMORALES ATRAVIESAN LA EMT MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LAS VÍAS TGF-B , WNT, HEDGEHOG Y NOTCH, SE DESPRENDEN DE LA MEMBRANA BASAL Y SE INTRAVASAN A LA CIRCULACIÓN PARA VIAJAR AL SITIO SECUNDARIO, COLONIZAN DIFERENTES ÓRGANOS MEDIANTE EL PROCESO DE LA MET. MODIFICADO DE “EMT IN BREAST CANCER METASTASIS: AN INTERPLAY OF MICRORNAs, SIGNALING PATHWAYS AND CIRCULATING TUMOR CELLS”, 2020.	11
FIGURA 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE EGFR Y SUS TERAPIAS DIRIGIDAS AL RECEPTOR. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE EGFR CULMINA EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR, MIGRACIÓN Y CONTROL DEL CICLO, APOPTOSIS Y ANGIOGÉNESIS. MODIFICADO DE “HER2-POSITIVE BREAST CANCER”, 2017.	12
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CROMOSOMAL 17q12-q21. MODIFICADA DE “THE HER2 AMPLICON IN BREAST CANCER: TOPOISOMERASE IIA AND BEYOND. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)”, 2013.	17
FIGURA 7. REACCIÓN DE PASO DE CADENA DE ADN CATALIZADA POR LA TOPOISOMERASA 2. LAS ENZIMAS TOP2 HIDROLIZAN EL ATP (ROJO), QUE ES NECESARIO PARA LIBERAR Y REINICIAR LA ENZIMA DESPUÉS DE CADA CICLO. TOP2 ESTÁN EN GRAN PARTE CONFINADAS A LAS CÉLULAS QUE PROLIFERAN EN LOS EUKARIONTES; EN PARTE POR ESA RAZÓN, HAN SIDO BLANCOS EFECTIVOS PARA MEDICAMENTOS CONTRA EL CÁNCER. ALGUNOS DE ESTOS FÁRMACOS INHIBEN LA TOPOISOMERASA 2 EN EL TERCER PASO DE LA FIGURA Y POR LO TANTO PRODUCEN ALTOS NIVELES DE ROTURAS DE DOBLE CADENA QUE DESTRUYEN LAS CÉLULAS QUE SE DIVIDEN RÁPIDAMENTE. LOS PEQUEÑOS CÍRCULOS AMARILLOS REPRESENTAN LOS FOSFATOS EN LA COLUMNA VERTEBRAL DEL ADN QUE SE UNEN DE FORMA COVALENTE A LA TOPOISOMERASA. MODIFICADO DE “MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL”, 2017.	19
FIGURA 8. MECANISMO PROPUESTO PARA LA INHIBICIÓN DE TOPOISOMERASA 2α DEPENDIENTE DE RESVERATROL. ESQUEMA QUE REPRESENTA LA MANERA EN QUE RESVERATROL INHIBE LA TOP2. LAS FLECHAS NEGRAS INDICAN EL CICLO ENZIMÁTICO TOP2 NO INHIBIDO, DONDE 2 ATP SE UNEN A LOS DOMINIOS ATP-GATE (ROSA) Y SE HIDROLIZAN PARA SEPARAR O UNIR LOS SEGMENTOS DEL ADN. LAS LÍNEAS ROJAS BLOQUEADAS INDICAN PASOS INHIBITORIOS, DONDE RESVERATROL SE UNE A LOS DOMINIOS ATP-GATE IMPIDIENDO LA UNIÓN DEL ATP. LOS DOMINIOS DE TOPOISOMERASA 2 α ESTÁN COLOREADOS COMO SE MUESTRA EN LA LEYENDA INFERIOR IZQUIERDA. EL SEGMENTO G DEL ADN SE MUESTRA EN NARANJA Y EL SEGMENTO T SE MUESTRA EN VERDE. MODIFICADO DE “RESVERATROL: A NOVEL TYPE OF TOPOISOMERASE II INHIBITOR. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY”, 2017.	22
FIGURA 9. EFECTO DE PACLITAXEL EN LA VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS SKBR3. SE SEMBRARON 30,000 CÉLULAS SKBR3, LAS CUALES FUERON TRATADAS CON DOSIS CRECIENTES DE PACLITAXEL DURANTE 48 HRS. SE REALIZARON 3 EXPERIMENTOS TÉCNICOS INDEPENDIENTES CADA UNO POR DUPLICADO. LA VIABILIDAD SE DETERMINÓ UTILIZANDO EL REACTIVO LUMINESCENCE CELLTITER-GLO (PROMEGA). SE CONSIDERARON RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS, AQUELLOS CON UNA P<0.05.	27
FIGURA 10. EFECTO DE RESVERATROL EN LA VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS SKBR3. SE SEMBRARON 30,000 CÉLULAS SKBR3, LAS CUALES FUERON TRATADAS CON DOSIS CRECIENTES DE RESVERATROL DURANTE 48 HRS. SE REALIZARON 3 EXPERIMENTOS TÉCNICOS INDEPENDIENTES CADA UNO POR DUPLICADO. LA VIABILIDAD SE DETERMINÓ UTILIZANDO EL REACTIVO LUMINESCENCE CELLTITER-GLO (PROMEGA). SE CONSIDERARON RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS, AQUELLOS CON UNA P<0.05.	27

FIGURA 11. EFECTO DE PACLITAXEL Y RESVERATROL EN LA VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS SKBR3. SE SEMBRARON 30,000 CÉLULAS SKBR3, LAS CUALES FUERON TRATADAS CON LAS DOSIS CORRESPONDIENTES A LA IC50 DE PACLITAXEL Y RESVERATROL DURANTE 48 HRS. SE REALIZARON 3 EXPERIMENTOS TÉCNICOS INDEPENDIENTES CADA UNO POR DUPLICADO. LA VIABILIDAD SE DETERMINÓ UTILIZANDO EL REACTIVO LUMINESCENCE CELL TITER-GLO (PROMEGA). SE CONSIDERARON RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS, AQUELLOS CON UNA $P < 0.05$	28
FIGURA 12. PCR EN PUNTO FINAL DE GAPDH. A) IMAGEN REPRESENTATIVA DE ELECTROFORESIS DE RNA TOTAL DE CÉLULAS SKBR3 TRATADAS CON DMSO; PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) DURANTE 6 HR EN UN GEL DE AGAROSA AL 1.2%, SE OBSERVAN LAS SUBUNIDADES RIBOSOMALES 28S Y 18S. B) IMAGEN REPRESENTATIVA DE ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE PCR EN PUNTO FINAL DE GAPDH DE LAS CELULAS SKBR3 TRATADAS CON DMSO PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) DURANTE 6 HR.	29
FIGURA 13. CURVA DE AMPLIFICACIÓN DE RPBL13A. CURVA DE AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN RPBL13A DE CÉLULAS SKBR3 TRATADAS CON DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) DURANTE 6HR Y 12 HR. SE OBSERVA LA AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL DE RPBL13A EN LAS DIFERENTES MUESTRAS. LAS REACCIONES DE qPCR SE REALIZARON UTILIZANDO EL FLUORÓFORO SYBR GREEN.	30
FIGURA 14. CURVA DE DISOCIACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO POR qPCR DEL GEN RPBL13A. CURVA DE DISOCIACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO DEL GEN RPBL13A DE CÉLULAS SKBR3 TRATADAS CON DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) DURANTE 6HR Y 12 HR. EN LA GRÁFICA SE OBSERVA QUE LA TEMPERATURA DE DISOCIACIÓN (87.5 GRADOS) DEL PRODUCTO AMPLIFICADO ES LA MISMA, POR LO CUAL TODAS LAS MUESTRAS TIENEN EL MISMO PRODUCTO.	30
FIGURA 15. EXPRESIÓN RELATIVA DE MALAT1 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES. SE REALIZO qPCR UTILIZANDO COMO SONDA A SYBR GREEN PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN DE MALAT1 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES. LA GRÁFICA MUESTRA LA EXPRESIÓN BASAL DEL RNA MENSAJERO DE MALAT1 EN LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231, MCF7, HeLa, NK/E6/E7, NKE7 Y SKBR3. AL NO CONTAR CON UN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS COMO CALIBRADOR, SOLO SE APLICÓ LA FÓRMULA $2^{-\Delta\Delta C_t}$	31
FIGURA 16. EXPRESIÓN RELATIVA DE MASPINA EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES. SE REALIZO qPCR UTILIZANDO COMO SONDA A SYBR GREEN PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN DE MASPINA EN DIFERENTES TIPOS DE LÍNEAS CELULARES. LA GRÁFICA MUESTRA LA EXPRESIÓN BASAL DEL RNA MENSAJERO DE MASPINA EN LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231, MCF7, HeLa, NK/E6/E7, NKE7 Y SKBR3. AL NO CONTAR CON UN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS COMO CALIBRADOR, SOLO SE APLICÓ LA FÓRMULA $2^{\Delta C_t}$	32
FIGURA 17. EXPRESIÓN RELATIVA DE MALAT1. SE REALIZÓ qPCR PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN MALAT1 UTILIZANDO EL cDNA DE CELULAS SKBR3 TRATADAS CON DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) A LAS 6 HR Y 12 HR. LOS RESULTADOS REPRESENTAN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE MALAT1 ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. SE REALIZARON 3 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDIENTES.	33
FIGURA 18. EXPRESIÓN RELATIVA DE MASPINA. SE REALIZÓ qPCR PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN MASPINA UTILIZANDO EL cDNA DE CELULAS SKBR3 TRATADAS CON, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) Y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) A LAS 12 HR. LOS RESULTADOS REPRESENTAN LA EXPRESIÓN DE MASPINA EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	33

1. MARCO TEORICO

1.1. Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todos los países del mundo (Sung et al., 2021). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un grupo de enfermedades que inician con el crecimiento descontrolado de células anormales (World Health Organization, 2022a). El cáncer se origina cuando las células adquieren mutaciones y proliferan sin control formando una masa o un conglomerado de células denominado tumor (American Society of Clinical Oncology, 2012).

La carcinogénesis es un proceso de múltiples alteraciones genéticas que promueven la progresión de células normales a células malignas. La carcinogénesis se caracteriza por presentar pasos intermedios que evolucionan progresivamente de la normalidad a través de estados premalignos hasta llegar a el cáncer invasivo. Hanahan y Weinberg en el 2000, propusieron 6 características (Hallmarks) que presentan la mayoría de los diferentes tipos de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000). En este año, Hanahan reclasificó los hallmarks de la siguiente manera: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, inestabilidad genómica, inflamación promotora de tumores, reprogramación del metabolismo energético celular, evasión del sistema inmune, plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética, microbiomas polimórficos y senescencia celular (Figura 1) (Hanahan, 2022).

La metástasis es responsable hasta del 90% de la mortalidad asociada a el cáncer; sin embargo, sigue siendo una de las características menos conocida de los hallmarks (Chaffer & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022). De acuerdo con Hanahan, la invasión y la metástasis permiten a las células cancerosas escapar del tumor primario y colonizar nuevos sitios del cuerpo, en donde los nutrientes y espacios no sean limitantes. La angiogénesis también favorece la metástasis de las células cancerosas al generar nueva vasculatura que permite que los tumores reciban nutrientes y oxígeno cruciales para la función y la supervivencia de las células. La angiogénesis también se encuentra incluida en los hallmarks del cáncer. (Hanahan, 2022).



Figura 1 . Hallmarks del cáncer. Modificado de “Hallmarks of Cancer: New Dimensions”, 2022.

1.1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad en la cual las células del tejido mamario se multiplican sin control; existen diferentes tipos de CaMa dependiendo del tipo celular del que se origina (CDC, 2021). El CaMa que se origina en las células epiteliales del revestimiento de los conductos se denomina ductal (85%), y la que se origina en los lóbulos del tejido glandular de la mama se denomina lobulillar (15%) (World Health Organization, 2022b). El CaMa se presenta en ambos sexos, sin embargo, es más frecuente en las mujeres (99%). De acuerdo con las características histopatológicas, el cáncer se clasifica en invasivo y no invasivo (*in situ*) (American Cancer Society, 2019b). El cáncer no invasivo con el paso del tiempo puede progresar e invadir el tejido mamario circundante y propagarse a los ganglios linfáticos cercanos o a otros órganos del cuerpo generando el cáncer invasivo. Frecuentemente, la muerte por CaMa es consecuencia de la metástasis generalizada (World Health Organization, 2022b).

En la carcinogénesis del CaMa, se han detectado múltiples mutaciones somáticas; sin embargo, algunas mutaciones de línea germinal se han detectado en los genes BRCA1 y BRCA2, los cuales son genes supresores de tumores, responsables de regular la reparación del DNA (Royfman et al., 2021). Los factores protectores que reducen el riesgo de CaMa son: lactancia materna prolongada, ejercicio físico habitual, control de peso, evitar el consumo de alcohol, evitar la exposición al humo de tabaco, evitar el uso prolongado de hormonas y evitar la exposición excesiva a radiación (Poorolajal et al., 2021).

1.1.2. Epidemiología de CaMa

El CaMa, es el cáncer más frecuente a nivel mundial en mujeres con un estimado de 2.3 millones de casos nuevos (11.7%), y el quinto lugar en mortalidad por cáncer con el 6.9% de defunciones (Figura 2) (Sung et al., 2021).

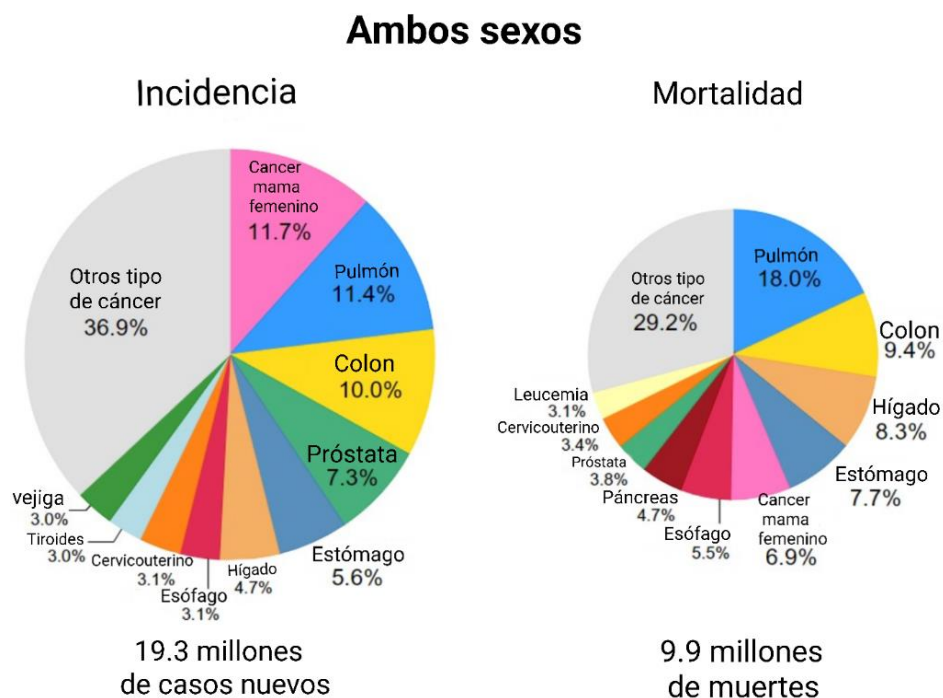


Figura 2. Distribución de Incidencia y Mortalidad de los 10 tipos de cáncer más comunes en 2020 para ambos sexos. Modificado de “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries “, 2021.

En México y en otros países en vías de desarrollo de Latinoamérica, el CaMa se presenta en promedio 10 años antes que, en países desarrollados, mientras que en países de Europa y Estados Unidos la media de edad de las pacientes con CaMa es de 63 años, en México la media de edad es de 51 años (Maffuz-Aziz et al., 2017). La incidencia y muerte por CaMa

es mayor en las mujeres jóvenes de todos los países de Latinoamérica en comparación con la de ingresos altos como Estados Unidos. El Instituto Nacional de Cancerología (INCan), reporto en un seguimiento de 26 meses en el 2013 que la tasa de incidencia fue del 31% y la mortalidad del 18% en México (Villarreal-Garza et al., 2013).

La tasa de incidencia de CaMa a nivel nacional es de 18.55 casos nuevos por cada 100 mil habitantes en una población de 20 años y más. Según las cifras preliminares del 2020, se registraron 7 880 defunciones por CaMa (INEGI, 2021). Desde mediados de la década de 2000, el CaMa invasivo en mujeres ha aumentado aproximadamente medio punto porcentual cada año, lo que convierte al CaMa en un grave problema para la Salud Pública (American Society of Clinical Oncology, 2022).

1.2. Glándula mamaria y CaMa

La glándula mamaria consta de 3 partes principales: lobulillos, conductos y tejido conectivo. Los lobulillos son las glándulas que producen leche; los conductos son los tubos que transportan la leche al pezón; el tejido conectivo rodea y sostiene todas las partes de la mama (CDC, 2021). Además, el tejido mamario esta vascularizado por vasos perforantes de la arteria, venas mamarias internas y vasos torácicos laterales; y el líquido intersticial de la glándula mamaria es drenado a través de los vasos linfáticos de la mama (Olivas-Menayo, 2017).

La vascularización es importante en el CaMa debido a que puede diseminarse de forma distante de la glándula mamaria a través de los vasos sanguíneos y vasos linfáticos a un órgano distante (CDC, 2021).

1.3. Estadios del CaMa

La numeración de los estadios del CaMa, considera tamaño del tumor, propagación a ganglios linfáticos, y diseminación a partes distantes del cuerpo. El sistema TNM se utiliza para clasificar el estadio de tumores sólidos y se describe de la siguiente manera: “T” más un numero (0 - 4) para describir el tamaño en centímetros; “N” para describir la extensión en los ganglios linfáticos regionales, los cuales incluyen ganglios linfáticos ubicados debajo del brazo (ganglios linfáticos axilares), por encima y debajo de la clavícula, y ganglios ubicados debajo del esternón (ganglios linfáticos mamarios internos). “M” indica si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, lo que se conoce como metástasis a distancia (American Cancer Society, 2019a).

El CaMa presenta 5 estadios (0-IV). El estadio 0 es *in situ*, el cual aún se ubica en el lugar donde se inició, no se disemina a los tejidos adyacentes y es factible ser extirpado por completo con cirugía. El estadio I no ha crecido profundamente en los tejidos adyacentes, no se ha diseminado en los ganglios linfáticos ni a otras partes del cuerpo y se denomina cáncer en estadio temprano. En el estadio II y III, los tumores han crecido profundamente en los tejidos adyacentes, es posible que se haya diseminado en los ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo. El cáncer estadio IV se ha diseminado a otros órganos o partes del cuerpo y se denomina cáncer avanzado o metastásico (American Society of Clinical Oncology, 2019).

2.4 Metástasis

La metástasis es la diseminación de células cancerosas desde el tumor primario a tejidos y órganos distantes, se produce a través de cualquiera de las 3 diferentes rutas: vasos sanguíneos, sistemas linfáticos y cavidades corporales (Martin & Jiang, 2009; Yeeravalli & Das, 2021).

En la metástasis se pueden observar 3 principales procesos (Figura 3):

- **Invasión:** se produce cuando las células cancerosas adquieren la capacidad de penetrar en tejidos circundantes atravesando la membrana basal y la matriz extracelular (MEC).
- **Intravasación:** las células cancerosas penetran el sistema linfático o vascular.
- **Extravasación:** las células cancerosas viajan a través del sistema circulatorio para invadir la membrana basal vascular y la MEC en un sitio secundario (Martin & Jiang, 2009).

La cascada metastásica se puede resumir en dos fases: la translocación física de una célula cancerosa desde el tumor primario al microambiente de un tejido distante y la colonización que se da por el crecimiento de micrometástasis en tumores macroscópicos. Los estudios experimentales y clínicos apoyan la hipótesis que las células cancerosas que persisten en sitios metastásicos pueden existir en 3 estados alternativos: 1) células cancerosas viables solitarias en un estado inactivo no proliferativo (latente); 2) micrometástasis que quedan en pequeñas lesiones; 3) lesiones macrometastásicas en crecimiento activo (Chaffer & Weinberg, 2011).

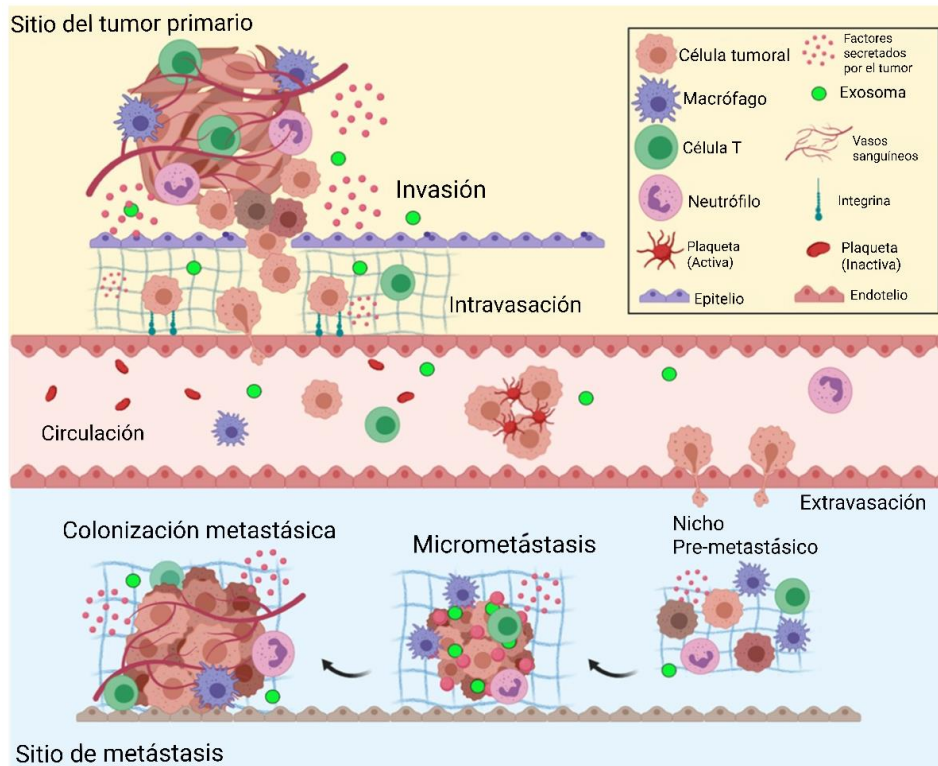


Figura 3. Cascada metastásica. Descripción general de los 3 principales procesos de la metástasis que incluyen la invasión, intravasación y extravasación. Modificado de Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited, 2020.

Las células cancerosas metastásicas experimentan la pérdida de adhesión célula-célula y generan cambios en las interacciones célula-matriz; con estos cambios también existe secreción de heparanasas y metaloproteinasas de matriz para degradar la membrana basal y la MEC. Por lo tanto, muchos biomarcadores metastásicos se han asociado con la desregulación de la MEC como claudina-7, proteína transmembranal de unión estrecha, la cual se utiliza como biomarcador pronóstico del CaMa ductal invasivo (Bernardi et al., 2012).

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso que se caracteriza porque las células epiteliales pierden la polaridad celular y la adhesión en la transición a un fenotipo de células metastásicas invasivas. La EMT se considera el medio a través del cual las células epiteliales transformadas adquieren la capacidad de invadir, resistir la apoptosis (anoikis) y diseminarse. Además, es un proceso involucrado en morfogénesis embrionaria y cicatrización de heridas. La EMT puede activarse de forma transitoria o estable en diferentes grados por las células cancerosas durante la invasión y metástasis (Figura 4). Por lo tanto, las células cancerosas que llevan a cabo la EMT durante la invasión inicial y la diseminación metastásica pueden pasar por el proceso inverso, denominado transición mesénquima-epitelio (MET). En este punto de EMT, las células entran a la circulación para migrar hacia un nuevo tejido, al salir

de la circulación llevan a cabo la MET para detener la migración y colonizar el nuevo tejido que ahora formara el tumor secundario. Las células cancerosas pueden entrar en un programa EMT solo parcialmente, adquiriendo nuevos rasgos mesenquimales mientras continúan expresando rasgos epiteliales residuales (Hanahan & Weinberg, 2011).

Reguladores de EMT en metástasis del cáncer de mama

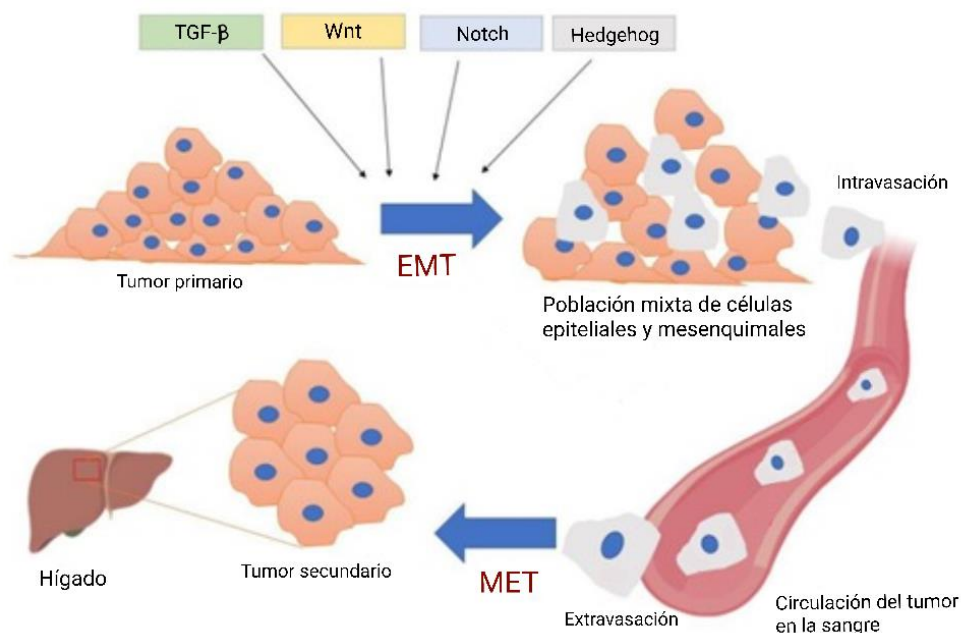


Figura 4. Representación esquemática de la transición epitelio mesénquima (EMT). Las células tumorales atraviesan la EMT mediante la regulación de las vías TGF- β , Wnt, Hedgehog y Notch, se desprenden de la membrana basal y se intravascan a la circulación para viajar al sitio secundario, colonizan diferentes órganos mediante el proceso de la MET. Modificado de "EMT in breast cancer metastasis: an interplay of microRNAs, signaling pathways and circulating tumor cells", 2020.

La EMT es regulada por factores de crecimiento y vías de señalización como TGF β , Wnt, Notch y Hedgehog. También, otros factores contribuyen a la EMT como la hipoxia, factores estresantes metabólicos, rigidez de la matriz, y moduladores postraduccionales epigenéticos (Fares et al., 2020). La regulación de la EMT está controlada por un conjunto de factores de transcripción como Snail, Slug, Twist y Zeb1/2; estos factores de transcripción trabajan en conjunto y permiten a la célula cancerosa a adquirir características de invasión y migración (A. Kumar et al., 2020).

El proceso de invasión por parte de las células cancerosas puede llevarse a cabo a través de dos vías: invasión colectiva, que implica conjunto de células cancerosas que avanzan en masa hacia los tejidos adyacentes; e invasión ameboide en la cual las células cancerosas individuales muestran plasticidad morfológica que permite deslizarse a través de los intersticios existentes en la matriz extracelular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Los genes o factores moleculares que desempeñan un papel clave en la migración y metástasis se pueden clasificar en 2 categorías: a) activadores de metástasis y b) supresores de metástasis (Yeeravalli & Das, 2021).

- a) Los principales activadores de metástasis son factores de crecimiento (TGF- β , IL-1), receptores (EGFR), factores de transcripción (ID1), proteínas de la matriz extracelular (VCAM-1) (Yeeravalli & Das, 2021).

Dentro de los factores de crecimiento involucrados en la metástasis en CaMa se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR. Entre el 15 y 30% de los tipos de CaMa que expresan niveles elevados de EGFR presentan un mal pronóstico, mientras que el 15 y el 35% de los tipos de CaMa invasivos que expresan altos niveles de EGFR2 (HER2) dan como resultado una disminución en la supervivencia de los pacientes. Tanto EGFR1 como HER2 contribuyen a la metástasis del cáncer de mamá hacia el cerebro. HER2 promueve diferenciación celular, migración y control del ciclo, apoptosis y angiogénesis. Trastuzumab y Pertuzumab son dos alternativas terapéuticas específicas para tumores que sobreexpresan HER2 (Figura 5) (Yeeravalli & Das, 2021).

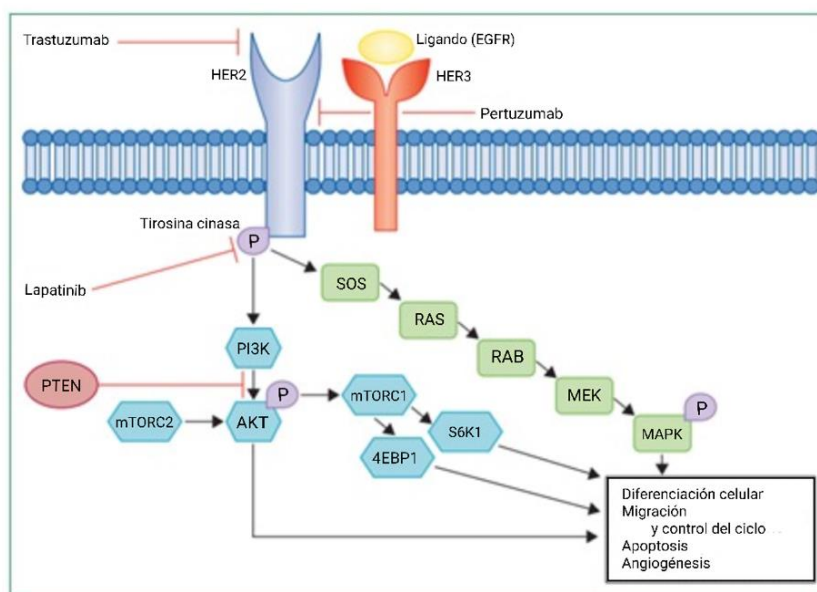


Figura 5. Vía de señalización de EGFR y sus terapias dirigidas al receptor. La vía de señalización de EGFR culmina en la diferenciación celular, migración y control del ciclo, apoptosis y angiogénesis. Modificado de “HER2-positive breast cancer”, 2017.

- b) Entre los principales supresores de metástasis se encuentran enzimas (Nm23), proteínas supresoras (BRMS1), vías de señalización MAP cinasas (RhoB, RKIP), receptores de

membrana (CD82), factores de transcripción (Myc) y proteínas de uniones estrechas (E-cadherina) (Yeeravalli & Das, 2021).

Dentro de estos supresores de metástasis, la pérdida de la función del gen E-cadherina favorece el incremento de proliferación, invasión y metástasis. Se ha reportado que una disminución en la expresión de E-cadherina se asocia a una mayor agresividad del cáncer; sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta correlación varía según el tipo de CaMa. Por ejemplo, en el carcinoma ductal invasivo, la E-cadherina promueve la metástasis, mientras que en el carcinoma lobulillar invasivo actúa como supresor de metástasis (Yeeravalli & Das, 2021).

La EMT se caracteriza por la disminución de marcadores epiteliales como E-cadherinas y δ -catenina e incremento simultáneo de marcadores mesenquimales como Vimentina, N-cadherina, fibronectinas y diversas metaloproteinasas de matriz (A. Kumar et al., 2020). La N-cadherina normalmente se expresa en neuronas migratorias y en células mesenquimales durante la organogénesis, y regula positivamente células de cáncer invasivo (Hanahan & Weinberg, 2011).

Además, en los tumores, la angiogénesis es requerida para el transporte de nutrientes y la eliminación de productos de desecho; los vasos sanguíneos proporcionan una ruta para que las células cancerosas que se han desprendido de la masa tumoral ingresen al sistema circulatorio y favorezcan la metástasis. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un blanco terapéutico clave en el desarrollo de terapias anti-angiogénicas para tratar diversos tipos de tumores (Sato & Itamochi, 2012).

Diversos genes han sido identificados en el proceso de metástasis, en este proyecto analizaremos la expresión de dos genes que inhiben metástasis:

El RNA largo no codificante MALAT1 (Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis) suprime metástasis en CaMa a través de EMT (Li et al., 2018; Jinesh & Brohl, 2020). MALAT1 se une e inactiva el factor de transcripción pro-metastásico TEAD, lo que lleva a la inhibición de la actividad transcripcional de TEAD (Kim et al., 2018). TEAD es mediador crítico de EMT y metástasis durante la progresión del cáncer, su activación interrumpe las uniones célula-célula, promueve la expresión de genes que promueven el fenotipo de células mesenquimales y aumenta la migración e invasión celular; además, contribuye a la EMT mediante la regulación positiva de Slug y ZEB1, que son los principales factores de transcripción de EMT (Huh et al., 2019). Además, MALAT1 se regula a través de un mecanismo dependiente de miRNAs por el supresor de tumores clave PTEN. A su vez, MALAT1 suprime migración e invasión de las células del CaMa al modular la expresión de genes como EpCAM que tiene capacidad oncogénica al promover la regulación positiva de c-myc y suprimir la expresión de E-cadherina e ITGB4, el cual aumenta la agresividad de los carcinomas y las neoplasias malignas (Kwok et al., 2018).

Por otra parte, Maspina (inhibidor de la serina proteasa mamaria) es la única serpina proapoptótica implicada en la regulación de la apoptosis en el CaMa. Se ha reportado que la expresión de Maspina se reduce en estadios avanzados de CaMa. Incluso, la ausencia de Maspina surge como indicador de progresión tumoral y potencial metastásico (Berardi et al., 2013). En el desarrollo, Maspina juega un papel esencial en la embriogénesis y un papel crítico en la diferenciación de células epiteliales (Bernardo et al., 2017). Además, se ha demostrado que Maspina muestra actividad supresora al inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis. Varios estudios demostraron que Maspina provoca cambios en la expresión de proteínas asociadas con el citoesqueleto de actina que predicen un fenotipo menos móvil e invasivo (Berardi et al., 2013; W. Zhang et al., 2005).

La función colectiva de Maspina es apoyar el fenotipo diferenciado de las células epiteliales, que incluye una organización polarizada y estable a través de la interacción célula-célula y célula-matriz (Bernardo et al., 2017). Maspina tiene localización nuclear y distribución subcelular. La localización nuclear de Maspina en las células cancerosas es necesaria para su actividad supresora de tumores. Se ha sugerido que en el núcleo Maspina se une a la cromatina y suprime la invasión y la metástasis en líneas celulares de CaMa (Berardi et al., 2013; Bernardo et al., 2017). Se ha reportado que en CaMa, Maspina interactúa y regula la actividad de HDAC1 regulando la relajación de la cromatina. Maspina se une y regula negativamente las regiones promotoras de los genes ESRRA y CSF1, dos genes cruciales en la progresión del CaMa, por lo que Maspina regula transcripcionalmente a los genes ESRRA y CSF1 a través de la actividad de HDAC1 (Goulet et al., 2011).

Dentro de la distribución subcelular, Maspina se encuentra predominantemente en el citoplasma, por lo que se secreta potencialmente a través de exosomas (Pemberton et al., 1997), como consecuencia de daño celular o necrosis. Se ha sugerido que Maspina secretada podría unirse a los componentes de la matriz extracelular (Berardi et al., 2013).

1.5 Clasificación histopatológica del CaMa

La clasificación histopatológica del CaMa se subdivide en dos tipos: pre-invasivo e invasivo. El subtipo pre-invasivo se divide a su vez en carcinoma ductal *in situ* (CDIS) que se desarrolla en los conductos y el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) que se desarrolla en los lobulillos. El subtipo invasivo se divide en carcinoma ductal, el cual se desarrolla a partir del CDIS, hace metástasis a través de los ganglios linfáticos y vasos sanguíneos, y el carcinoma lobulillar (CLI) que contiene células tumorales aisladas con mutaciones en el gen de E-cadherina, hace metástasis preferentemente en pulmón y cerebro. (Harbeck et al., 2019).

En México, el diagnóstico y los esquemas de tratamiento para CaMa se basan principalmente en la presencia o ausencia de receptores. A continuación, se describen los 3 subtipos de CaMa con base en esta clasificación.

1.5.1. Receptores hormonales (RE y RP)

Los receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP) presentan una estructura similar, que incluye dominios de unión a hormonas, señal de localización nuclear, unión a DNA y transactivación. Estos receptores se activan después de la unión de hormonas de alta afinidad y, una vez activados, funcionan como factores de transcripción al unirse a los promotores de los genes blanco. Entre el 70-75% de los carcinomas de mama sobreexpresan RE y RP. Existen 2 isoformas del RE codificadas por genes ubicados en diferentes cromosomas: RE alfa y RE beta, los cuales comparten una alta homología de secuencia. En el caso del RP, el gen codifica para 2 proteínas principales, la isoforma B (RPB) y la isoforma A (PRA) (Lamb et al., 2019).

La identificación del RE es importante porque es un marcador pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento. En contraste, la cuantificación del RP solo tiene valor pronóstico (Lamb et al., 2019). Aunque existe correlación directa entre los niveles de RP y la respuesta a terapia hormonal, los tumores con muy baja expresión de RP ($\geq 1\%$) tienen probabilidad de responder (Candanedo-González & Pérez-Salazar, 2012).

1.5.2 Triple negativo (TN)

El CaMa triple negativo (TN) se caracteriza por la ausencia de expresión de RE y RP y expresión y/o amplificación de HER2; representa del 10 al 20% de los CaMa invasivos (P. Kumar & Aggarwal, 2016).

No existe opción de tratamiento para CaMa subtipo TN. Debido a la falta de expresión de blancos terapéuticos, la quimioterapia es la única opción de tratamiento primario, junto con la radioterapia y la cirugía. El CaMa TN se caracteriza por su curso clínico agresivo y de mal pronóstico en comparación con los otros subtipos de CaMa (Uscanga-Perales et al., 2019).

1.5.3 Receptor 2 del factor de crecimiento Epidérmico (HER2)

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La sobreexpresión de HER2 es un factor de riesgo pronóstico y predictivo negativo para la supervivencia (Loibl & Gianni, 2017). La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico incluye EGFR, HER2, HER3 y HER4, de los cuales estructuralmente HER2 contiene una región extracelular más grande en comparación a los otros receptores, un dominio transmembrana y una región intracelular que incluye el dominio tirosina cinasa (Hart et al., 2020). La transducción de

señales de la familia de receptores de EGFR se realiza a través de la homo- o heterodimerización de los receptores para posteriormente activar vías como PI3K/AKT, Ras/MEK/ERK y JAK/STAT que regulan la supervivencia celular, proliferación, diferenciación, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Albagoush & Limaiem, 2021; Goutsouliak et al., 2020).

El CaMa HER2+ es un subtipo que sobreexpresa el receptor tirosina cinasa HER2, amplificando la señal de HER2. La sobreexpresión y amplificación de HER2 ocurre en el 20-30% del CaMa (Hart et al., 2020). Los pacientes con CaMa HER2 + se caracterizan por presentar una enfermedad más agresiva, mayor probabilidad de metástasis en ganglios linfáticos, disminución de la expresión del RE, resistencia a terapia endocrina y suelen responder a la terapias anti-HER2 (Loibl & Gianni, 2017).

La señalización de HER2 se ve afectada por la dimerización con otros miembros de la familia EGFR. La fosforilación y activación de HER2 está impulsada por su dimerización con diversos miembros de la familia de EGFR. El heterodímero HER2/HER3 es responsable principalmente de la activación del receptor HER3 que tiene un dominio cinasa inactivo; este heterodímero es importante para la señalización de PI3K/Akt en tumores HER2+. De esta forma, la sobreexpresión de HER2 promueve la señalización de otros receptores (Hart et al., 2020). Diversos artículos han reportado que la sobreexpresión de HER2 es debida a la amplificación de la región cromosomal en la que se localiza este gen, región a la que se le ha denominado Amplicón de HER2.

1.5.4 Amplicón HER2

El amplicón HER2 (Chr17q12-21) está conformado por alrededor de 15 genes como HER2, MED1, STARD3, HER2, GRB7, THRA, RAR α , TOP2 α , IGFBP4, CCR7, KRT20, KRT19 y GAST y cuenta con una región de amplificación que se extiende de 34.73 Mb a 35.48 Mb. El gen HER2 presenta la frecuencia más alta de amplificación y la frecuencia de amplificación de un gen disminuye con respecto a su distancia de HER2, esto sugiere que la inestabilidad dentro de Chr17q, es impulsada por el amplicón de HER2 (Figura 6) (Jacot et al., 2013).

La amplificación de HER2 es un factor de pronóstico adverso, con mayor probabilidad de metástasis y una menor supervivencia; además, es un factor predictivo de respuesta a la terapia anti-HER2 (Jacot et al., 2013). Uno de los genes localizado a 2Mb de HER2 que también está implicado en CaMa es TOP2 α (Jacot et al., 2013) En un estudio realizado en pacientes con CaMa se observó la coamplificación de TOP2 α y HER2 en el 35,4 % de los tumores positivos para HER2 (Ataseven et al., 2012).

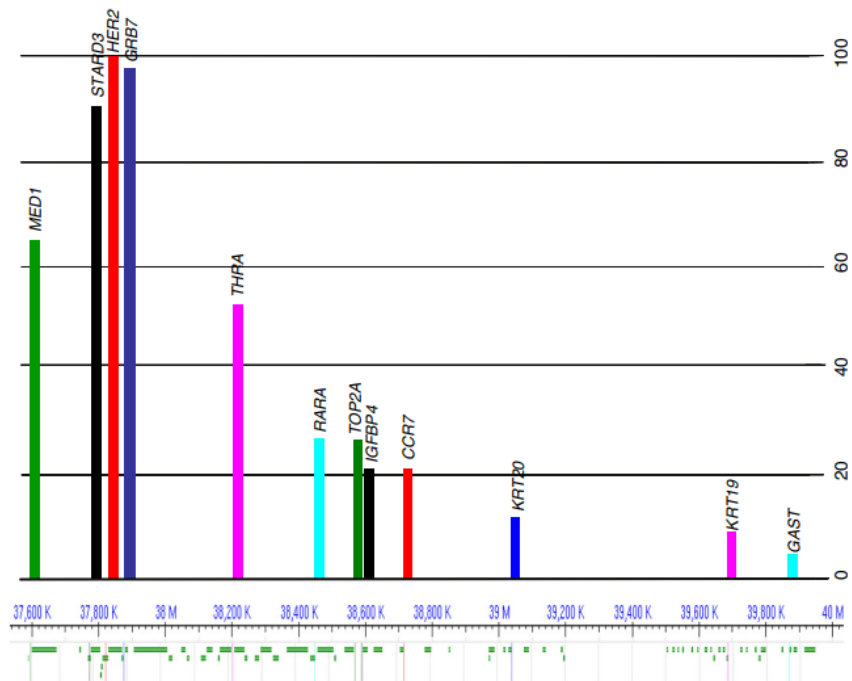


Figura 6. Distribución de la amplificación de la región cromosomal 17q12-q21. Modificada de “The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*”, 2013.

1.5.5 Topoisomerasas.

Las topoisomerasas (TOP) son enzimas ubicuas que modulan el estado topológico del ADN en la célula, eliminan nudos y enredos creando rupturas transitorias en la hélice del ADN (Leone et al., 2010). La TOP agrega covalentemente un fosfato al ADN, rompiendo así un enlace fosfodiéster en una cadena de ADN. Esta reacción es reversible y el enlace fosfodiéster se vuelve a formar a medida que TOP se retira (Alberts, 2017).

Las topoisomerasas de ADN se pueden dividir en dos clases: las topoisomerasas de tipo 1, las cuales tienen estructura monomérica e introducen roturas transitorias en las hebras simples del ADN, mientras que las topoisomerasas de tipo 2 presentan estructuras homodiméricas e introducen roturas bicatenarias transitorias (Bush et al., 2015). Las topoisomerasas humanas comprenden una familia de seis enzimas: cuatro topoisomerasas de tipo 1 (TOP1, TOP1MT, TOP3 α y TOP3 β) y dos de tipo 2 (TOP2 α y TOP2 β) (Pommier et al., 2022).

Las topoisomerasas 1 (TOP1) actúa en la replicación formando transitoriamente un enlace covalente único con el ADN, esto permite la libre rotación del ADN alrededor de los enlaces covalentes unidos al fosfato. Cualquier tensión en la hélice del ADN impulsará esta rotación en la dirección que alivia la tensión. Como resultado, la replicación del ADN puede ocurrir con la rotación de sólo una pequeña longitud de hélice (Alberts, 2017).

Las topoisomerasas 2 (TOP2) relajan el ADN superenrollado tanto positiva como negativamente de manera dependiente de ATP y Mg²⁺ (Bush et al., 2015). TOP2 es una enzima esencial que gestiona los superenrollamientos formados durante procesos celulares como la replicación y la transcripción, también libera la torsión de segmentos de ADN de doble cadena enredados para promover la segregación cromosómica. TOP2 utiliza el mecanismo denominado "paso de cadena" del ADN, que acopla la hidrólisis de ATP para la formación de rupturas transitorias de doble cadena (DSB) mediadas por TOP2 para trasladar físicamente un dúplex de ADN a través de otro (Lee et al., 2017). Estas enzimas son activadas cuando dos hélices dobles se cruzan entre sí, como las generadas por superenrollamiento frente a una horquilla de replicación. Una vez que TOP2 se une a dicho sitio de cruce, la proteína usa la hidrólisis de ATP para realizar el siguiente conjunto de reacciones de manera eficiente: 1) rompe una doble hélice de manera reversible para crear una "puerta" de ADN; 2) hace que la segunda doble hélice pase a través de esta abertura; 3) vuelve a sellar la ruptura y se disocia del ADN. TOP2 desenreda gradualmente las cadenas de ADN concatenadas entre la fase S y la mitosis temprana (Figura 7) (Alberts, 2017).

De las dos isoformas de TOP2 (alfa y beta) (Lee et al., 2017), el gen TOP2 α se encuentra en el cromosoma 17, mientras que el gen de TOP2 β en el cromosoma 3 (Tan et al., 1992). TOP2 α es esencial para la supervivencia de células en crecimiento activo y se encuentra en la replicación. TOP2 β aún no se ha definido su función. TOP2 α es blanco de algunos fármacos anticancerígenos, ya que su función es requerida para que las células se dividan activamente, y la interrupción de la función enzimática pueda inducir daño en el ADN generando un efecto citotóxico (Lee et al., 2017). Estos fármacos se dividen en dos clases: 1) según su capacidad para inhibir la actividad catalítica de TOP2 α o 2) para aumentar el nivel de complejos covalentes de TOP2 α -ADN (Leone et al., 2010). En este proyecto se utilizará Resveratrol que se clasifica dentro de la primera clase, debido a que inhibe la actividad de TOP2 α .

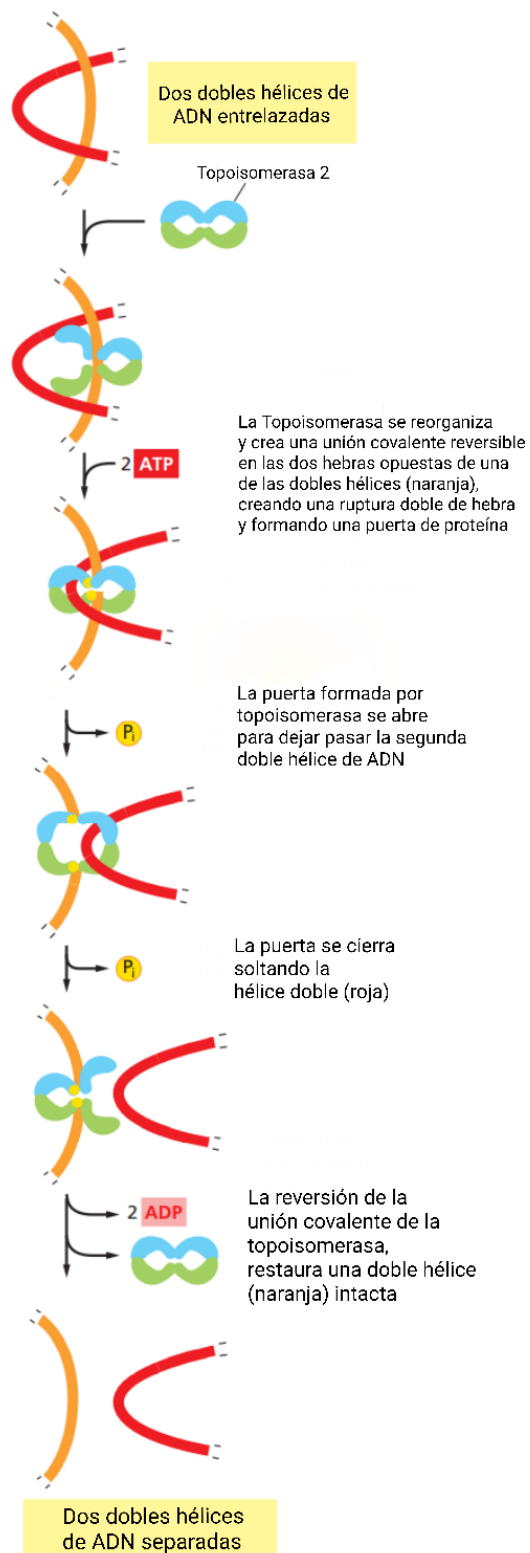


Figura 7. Reacción de paso de cadena de ADN catalizada por la topoisomerasa 2. Las enzimas TOP2 hidrolizan el ATP (rojo), que es necesario para liberar y reiniciar la enzima después de cada ciclo. TOP2 están en gran parte confinadas a las células que proliferan en los eucariontes; en parte por esa razón, han sido blancos efectivos para medicamentos contra el cáncer. Algunos de estos fármacos inhiben la topoisomerasa 2

en el tercer paso de la figura y por lo tanto producen altos niveles de roturas de doble cadena que destruyen las células que se dividen rápidamente. Los pequeños círculos amarillos representan los fosfatos en la columna vertebral del ADN que se unen de forma covalente a la topoisomerasa. Modificado de "Molecular Biology of the Cell", 2017.

1.6 Tratamiento de primera y segunda línea para tumores HER2+

El tratamiento del CaMa debe ser individualizado y basado en una medicina personalizada. (Santaballa B, 2020). Habitualmente, el tratamiento de primera línea para el CaMa HER2+ es una combinación de pertuzumab, trastuzumab y quimioterapia con antraciclinas. El tratamiento de segunda línea a base de taxanos (Paclitaxel) se usa en pacientes con CaMa en donde, 1) CaMa se diseminó durante el tratamiento con trastuzumab, 2) en donde hay recurrencia en un lapso de 12 meses después de detener el tratamiento con trastuzumab o 3) si el cáncer progresa mientras se recibe tratamiento de primera línea (American Society of Clinical Oncology, 2017). Cuando los tratamientos de primera línea dejan de ser efectivos contra el CaMa inicia un tratamiento de segunda línea a base de quimioterapia.

1.6.1. Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir células cancerosas, generalmente impactan en la proliferación y la división de las células cancerosas; sin embargo, en muchas ocasiones los fármacos generan efectos colaterales en las células sanas (American Society of Clinical Oncology, 2017).

El CaMa localmente avanzado e inoperable se aborda con una quimioterapia neoadyuvante que ayuda a reducir los tumores para lograr que estos sean operables. Actualmente, la terapia neoadyuvante se utiliza en el CaMa en estadios tempranos y avanzados. El tratamiento adyuvante está dirigido al control de células residuales y metastásicas restantes de la enfermedad, para reducir las tasas de recurrencia y mejorar la supervivencia a largo plazo (Fisusi & Akala, 2019).

La quimioterapia para el CaMa metastásico varía en cuanto al tiempo de administración que puede ser una vez por semana, cada dos, cada tres o cada cuatro semanas. La quimioterapia se administra durante al menos 4 a 6 meses o hasta que el paciente experimenta demasiados efectos secundarios. Una persona con CaMa metastásico generalmente recibe 1 fármaco a la vez en lugar de una combinación; sin embargo, ocasionalmente se recomienda un régimen de combinación. La mejor opción de quimioterapia para cada paciente depende de varios factores, del tratamiento anterior recibido, posibles efectos secundarios y la salud en general del paciente (American Society of Clinical Oncology, 2017). Uno de los fármacos comúnmente utilizados en quimioterapia en CaMa es Paclitaxel.

1.6.2. Paclitaxel

Paclitaxel (PTX) es un agente estabilizador de microtúbulos (Alqahtani et al., 2019). Los microtúbulos son polímeros cilíndricos compuestos de dímeros de tubulina. Las tubulinas α y β se ensamblan para formar heterodímeros que constituyen los microtúbulos. La tubulina es una proteína de mantenimiento, ya que los microtúbulos participan en actividades celulares esenciales entre las que se incluye la división celular (Wordeman & Vicente, 2021).

Paclitaxel se une a los 31 aminoácidos N-terminales de la subunidad β -tubulina en el microtúbulo, estabiliza los microtúbulos y detiene la mitosis de las células somáticas en G2/M durante la división celular (Alqahtani et al., 2019). Debido a que las fases G2 y M son las fases más radiosensibles del ciclo celular, el Paclitaxel también es un potente radiosensibilizador. Paclitaxel presenta efectos biológicos adicionales, como alterar la señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno, Raf-1, tirosina cinasas, JNK y óxido nítrico sintasa. También, desencadena la apoptosis a través de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis como Bcl-2, Bad y Bcl-xL; a bajas concentraciones inhibe selectivamente la angiogénesis (Marupudi et al., 2007).

Paclitaxel se usa como agente de segunda línea en CaMa combinado con trastuzumab (IMSS, 2017), para el tratamiento de CaMa metastásico después del fracaso de la quimioterapia combinada o la recurrencia dentro de los 6 meses de la quimioterapia adyuvante (Alqahtani et al., 2019). Recientemente, algunas alternativas experimentales de tratamiento incluyen el tratamiento combinado de Paclitaxel, con fármacos que inhiben vías de transducción de señales, como la inhibición de la vía de TOP2 α .

1.6.3 Resveratrol (RSV)

Resveratrol (RSV) es un polifenol natural que se encuentra en la cascara de frutos rojos, incluidas las uvas y las moras (Demoulin et al., 2015). Se ha reportado que Resveratrol inhibe la proliferación de células cancerosas, lo que lleva a la apoptosis (Leone et al., 2010). Resveratrol actúa como un supresor de procesos inflamatorios que pueden influir en la progresión del cáncer; también está relacionada con su capacidad para inhibir la invasión tumoral, la metástasis y la neoangiogénesis (Demoulin et al., 2015).

El mecanismo de acción del Resveratrol consiste en inhibir la actividad catalítica de TOP2 α al unirse al dominio ATPasa. En la Figura 8, se observa este mecanismo, en donde las flechas negras indican el ciclo enzimático de la TOP2 α no inhibido y las líneas rojas bloqueadas indican pasos inhibitorios (Lee et al., 2017).

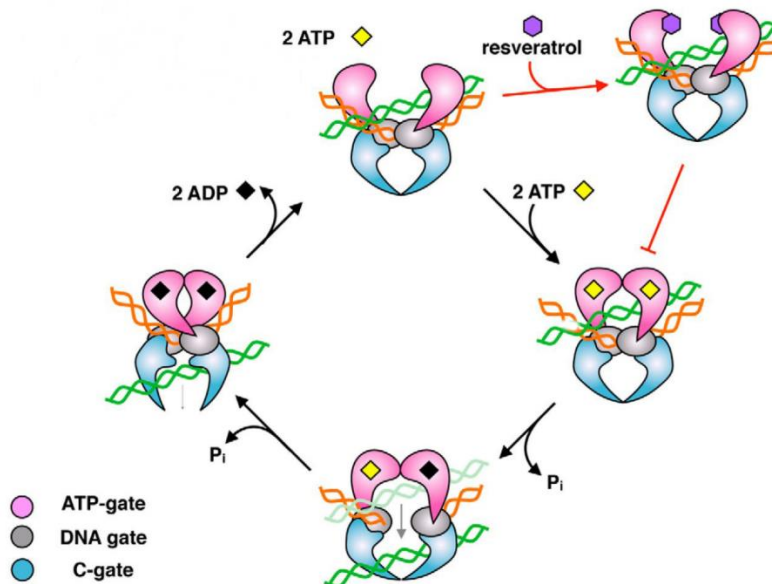


Figura 8. Mecanismo propuesto para la inhibición de topoisomerasa 2 α dependiente de Resveratrol. Esquema que representa la manera en que Resveratrol inhibe la TOP2. Las flechas negras indican el ciclo enzimático TOP2 no inhibido, donde 2 ATP se unen a los dominios ATP-gate (rosa) y se hidrolizan para separar o unir los segmentos del ADN. Las líneas rojas bloqueadas indican pasos inhibitorios, donde Resveratrol se une a los dominios ATP-gate impidiendo la unión del ATP. Los dominios de topoisomerasa 2 α están coloreados como se muestra en la leyenda inferior izquierda. El segmento G del ADN se muestra en naranja y el segmento T se muestra en verde. Modificado de "Resveratrol: A novel type of topoisomerase II inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*", 2017.

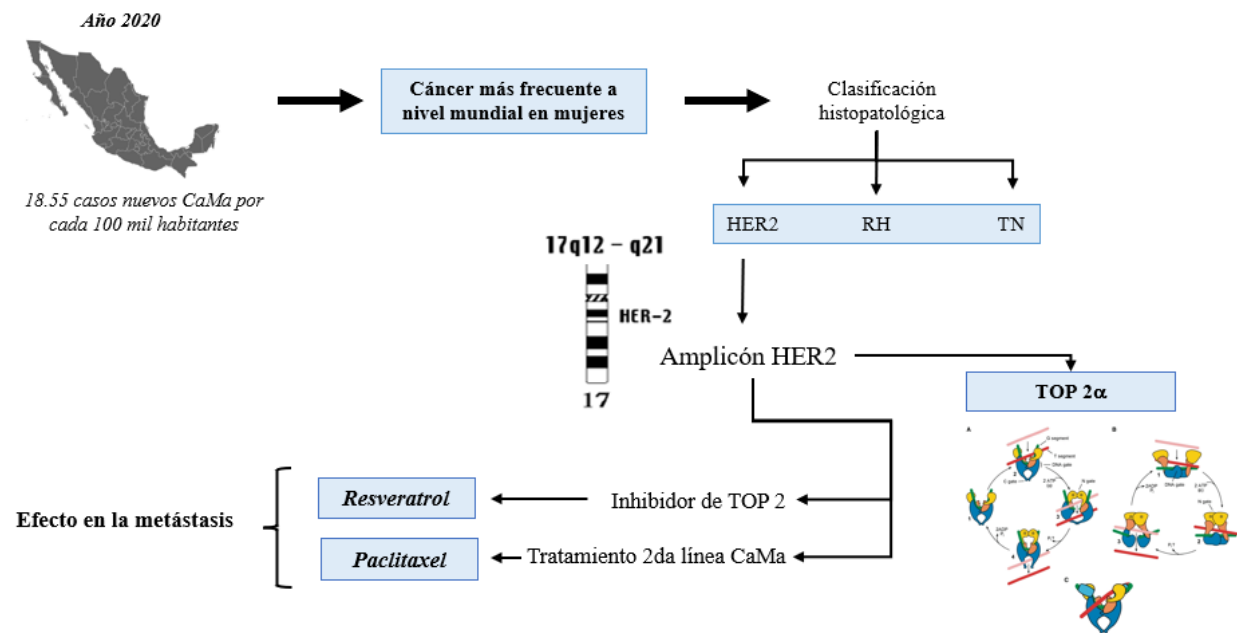
1.7 Antecedentes específicos

Li Gang y colaboradores exploraron el efecto y el mecanismo de Paclitaxel en la proliferación, apoptosis e invasión de células de CaMa, encontrando que Paclitaxel puede inhibir la proliferación e invasión en células MCF-7 promoviendo apoptosis al regular la expresión de p-AKT (Thr308) y p-AKT (Ser473) en la vía de señalización PI3K/AKT (Li et al., 2020). Por otro lado, Lee Joyce y colaboradores evaluaron el efecto de Resveratrol como inhibidor de TOP2 α , debido a que es químicamente similar a ICRF-187, inhibidor de TOP2 α , encontrando que Resveratrol afecta la función de TOP2 α , sugiriendo que otros polifenoles podrían estar inhibiendo esta enzima (Lee et al., 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La metástasis es la causa del 90% de la mortalidad por cáncer. El subtipo de CaMa HER2+ se caracteriza por presentar amplificaciones en la región 17q12-q21, alteraciones que generan el amplicón de HER2. Este evento se considera de mal pronóstico y mayor probabilidad de metástasis. El amplicón contiene genes amplificados/deletados que participan en el desarrollo de CaMa, como lo es TOP2 α . En este trabajo se identificará si la inhibición de TOP2 α con Resveratrol y el tratamiento con Paclitaxel en la línea celular de CaMa, SKBR3 inhiben la metástasis de esta línea celular a través de la expresión del RNA largo no codificante MALAT1 y el gen Maspina.

3. MAPA CONCEPTUAL



4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La inhibición de la vía de TOP2 α en la línea celular SKBR3 tratadas con Paclitaxel induce la expresión de los genes asociados a metástasis, maspina y MALAT1?

5. HIPÓTESIS

La inhibición de la actividad de TOP2 α en células SKBR3 tratadas con Paclitaxel induce la expresión de los genes asociados a metástasis, maspina y MALAT1.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Evaluar si la inhibición de la vía de TOP2 α en células SKBR3 tratadas con Paclitaxel induce la expresión de los genes asociados a metástasis, maspina y MALAT1.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar si la inhibición de la actividad de TOP2 α y el tratamiento con Paclitaxel disminuye la viabilidad de la línea celular SKBR3
- Analizar la expresión de los genes maspina y MALAT1 que participan en la regulación de la metástasis en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel.

7. METODOLOGÍA

Cultivo de las líneas celulares de CaMa.

Se utilizó la línea celular de CaMa SKBR3 (subtipo de CaMa HER2+). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1X de antibiótico-antimicótico en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Evaluación de viabilidad celular

Se cultivaron 30,000 células SKBR3 en cada pozo en una placa de 96 pozos. Después de 16 horas de cultivo las células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de los fármacos Paclitaxel y Resveratrol. Trascorridas 48 hrs de incubación, se evaluó la viabilidad celular agregando 100 uL por pozo del reactivo de luminiscencia CellTiter-Glo (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay). Las placas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (T.A). Posteriormente se cuantificó la luminiscencia en un luminómetro. Se normalizó el valor de células control no tratadas como el 100% de viabilidad celular para ajustar los valores de los diversos tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. Una reacción blanco se incluyó en cada lectura.

Extracción de RNA

Posterior a 48 hrs de tratamiento con Paclitaxel, Resveratrol y Paclitaxel+Resveratrol, 8 x 10⁵ células SKBR3 fueron sembradas en placas de 6 pozos fueron desprendidas y centrifugadas en un tubo de 1.5 ml. Se agrego 1 mL de TRIzol a cada tubo que contiene el pellet de células, homogenizando cuidadosamente. Los tubos se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron a cada tubo 200 µL de cloroformo; la mezcla se homogenizo invirtiendo los tubos y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 13,000 rpm a una temperatura de 4°C. Se recupero la fase acuosa y se colocó en otro tubo; se agregaron 800 µL de isopropanol, incubando a -20°C por 15 minutos. Nuevamente, se centrifugaron los tubos por 15 minutos a 13,000 rpm a una temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante de cada tubo y se agregaron 800 µL de etanol/DEPC al 75%. Posteriormente, se centrifugaron 5 minutos a 7,500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se invirtió el tubo para evaporar el etanol. Finalmente, el RNA se resuspendió en 20 µL de agua DEPC y se cuantificó en un lector de absorbancia (NanoDrop). Se analizó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, se realizó tratamiento con DNAsa libre de RNAsas utilizando 2 ug de RNA de cada réplica, junto con el buffer de reacción y agua. La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Posterior a la incubación, se agregó 1 µL de la solución de paro e incubando por 10 minutos a 65°C para inactivar la DNAsa. La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó con 1 ug de RNA tratado con DNAsa, 0.5 µg de oligo dT y 10 U de inhibidores de RNAsas aforando con agua (grado Biología Molecular) a 11 µL. Posteriormente, se incubo por 5 minutos a 65°C. Al término de la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 5 min. Se adiciono una mezcla de 2.5 mM de dNTPs, 1X de Buffer de la Transcriptasa inversa y 200 U de Transcriptasa Inversa contenidos en 9 µL. Los tubos se incubaron por 1 hora a 37°C. Una última incubación se realizó a 70°C por 10 minutos. Para verificar la correcta síntesis del cDNA se realizó una PCR punto final utilizando oligonucleótidos del gen constitutivo GAPDH (F: 5' GTG TTC CTA CCC CCA ATG TGT- 3'; R: 5'-ATT GTC ATA CCA GGA AAT GAG CTT-3'), los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

qPCR cuantitativo

Las reacciones de qPCR se realizaron con SYBR Green en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Se realizo qPCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean una región de los genes de interés que regulan la metástasis (Maspina F: 5'-ATC TGT CTC TCC ACC TCT CTG-3'; Maspina R: 5'-ATC CGA TGT TAC TGT TTG AAA TCC-3', MALAT1 F:5'-GTA AAC TAT ACC TAC TGT CCC TCA A-3', MALAT1 R: 5'-

AGA AAT ACT TAA ATT ACT AGC GTG TGG-3') y el gen constitutivo RPBL13A. Los oligonucleótidos Maspina y MALAT1 fueron diseñados utilizando el programa Predesigned qPCR Assays de la empresa IDT. El oligonucleótido RPBL13A fue adquirido a la empresa Qiagen. Para las reacciones de qPCR, se utilizaron 200 ng de cDNA y 5 pMol de cada primer, 1X de SYBR Green y agua grado biología molecular necesaria para un volumen total de 10 μ L. Obtenidos los datos de Ct de cada gen con sus tres réplicas se realizó el análisis de expresión utilizando el gen constitutivo RPBL13A. Se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad. Para evaluar la normalidad de los resultados se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se analizaron las diferencias entre el grupo control con los diferentes tratamientos mediante la prueba U de Mann-Whitney, en el cual un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS

8.1 La inhibición de la actividad de TOP2 α y el tratamiento con Paclitaxel disminuyen la viabilidad de la línea celular SKBR3

Para determinar el efecto de la inhibición de la actividad de TOP2 α por Resveratrol y el tratamiento con Paclitaxel, se evaluó la viabilidad de la línea celular SKBR3. Se realizaron 3 ensayos independientes por duplicado en presencia de concentraciones crecientes de Paclitaxel (40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 120 nM) y Resveratrol (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M y 200 μ M). Con este ensayo se identificó la concentración que inhibe el 50% de la viabilidad celular (IC50). El porcentaje de viabilidad fue normalizado con respecto a células control no tratadas.

Se observó que para el tratamiento con Paclitaxel la concentración que corresponde a la IC50 fue de 120 nM (Figura 9). En el caso del tratamiento con Resveratrol, la concentración identificada para la IC50 fue de 150 μ M (Figura 10). Todos los tratamientos fueron encontrados diferentes estadísticamente con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

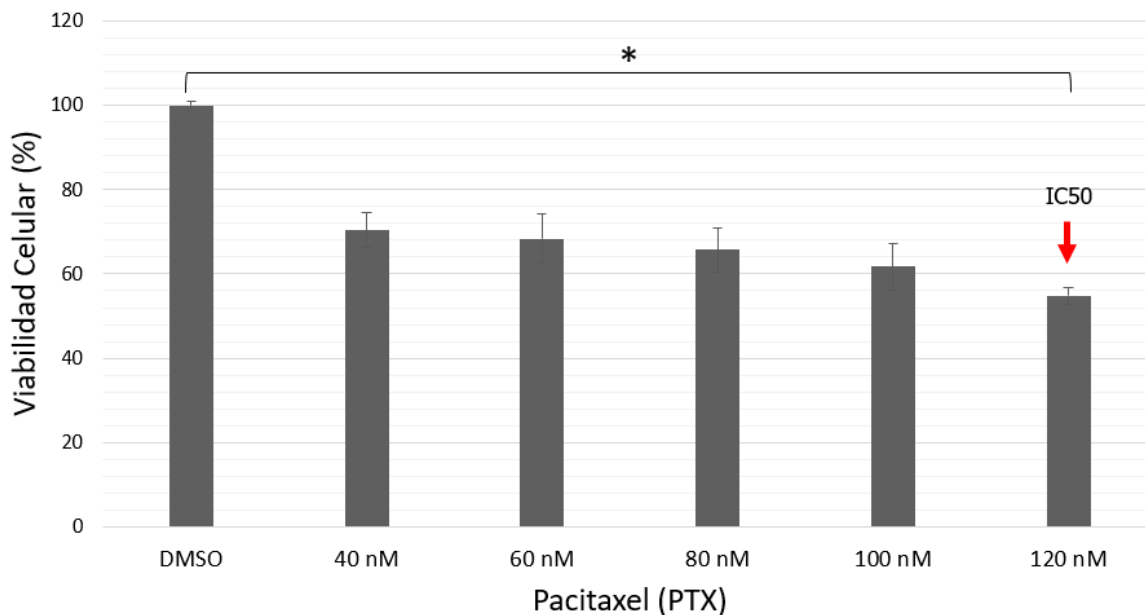


Figura 9. Efecto de Paclitaxel en la viabilidad celular de células SKBR3. Se sembraron 30,000 células SKBR3, las cuales fueron tratadas con dosis crecientes de Paclitaxel durante 48 hrs. Se realizaron 3 experimentos técnicos independientes cada uno por duplicado. La viabilidad se determinó utilizando el reactivo Luminiscence CellTiter-Glo (Promega). Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$.

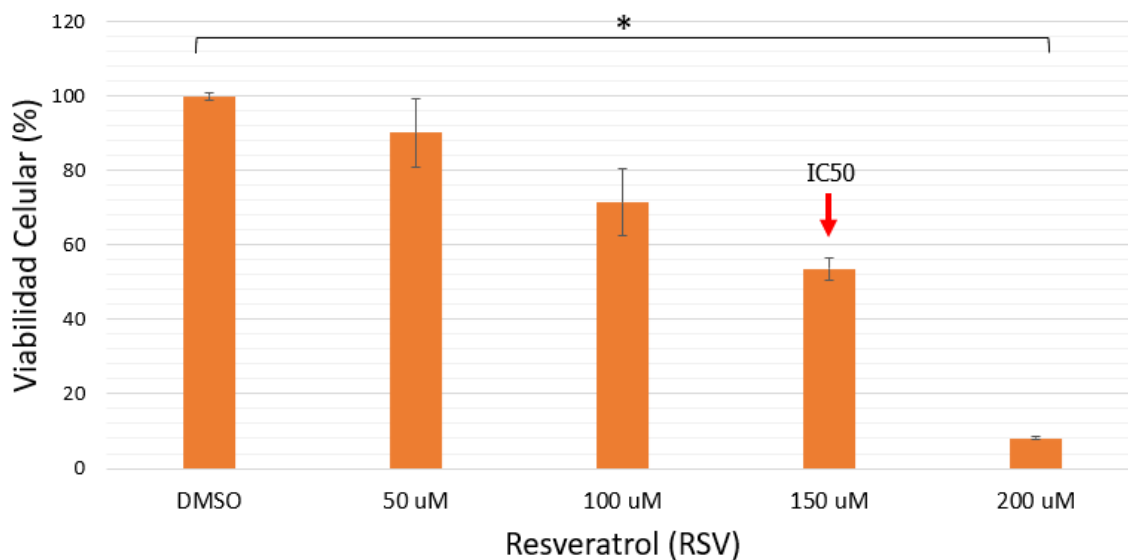


Figura 10. Efecto de Resveratrol en la viabilidad celular de células SKBR3. Se sembraron 30,000 células SKBR3, las cuales fueron tratadas con dosis crecientes de Resveratrol durante 48 hrs. Se realizaron 3 experimentos técnicos independientes cada uno por duplicado. La viabilidad se determinó utilizando el reactivo Luminiscence CellTiter-Glo (Promega). Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$.

Posterior a la determinación del IC50, se llevó a cabo un ensayo con la combinación de las concentraciones correspondientes a la IC50 de cada fármaco, para evaluar su efecto en conjunto, se realizaron 3 ensayos independientes por duplicado. Se observó que la combinación de fármacos no tuvo un efecto aditivo comparado con los tratamientos individuales. Los diferentes tratamientos fueron diferentes estadísticamente comparados con el control ($p < 0.05$) (Figura 11).

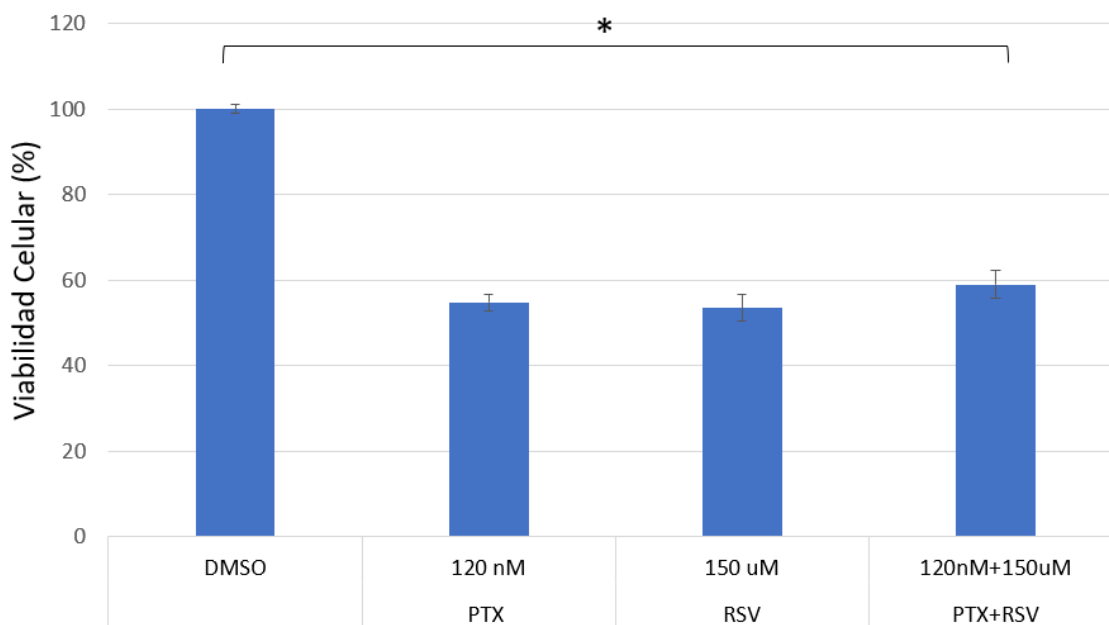


Figura 11. Efecto de Paclitaxel y Resveratrol en la viabilidad celular de células SKBR3. Se sembraron 30,000 células SKBR3, las cuales fueron tratadas con las dosis correspondientes a la IC50 de Paclitaxel y Resveratrol durante 48 hrs. Se realizaron 3 experimentos técnicos independientes cada uno por duplicado. La viabilidad se determinó utilizando el reactivo Luminiscence CellTiter-Glo (Promega). Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$.

8.2 Análisis de la expresión de genes que participan en la regulación de la metástasis en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel.

Para analizar la expresión de MALAT1 y Maspina, los cuales son genes que participan en la regulación de la metástasis en cáncer. Se sembraron células SKBR3 en presencia de las concentraciones previamente identificadas de Paclitaxel, Resveratrol y la combinación de ambos fármacos durante 6 hr y 12 hr. Posterior al tratamiento se realizó la extracción del RNA y se verificó su integridad a través de la identificación de las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S (Figura 12A). Verificada la integridad se realizó la síntesis del cDNA.

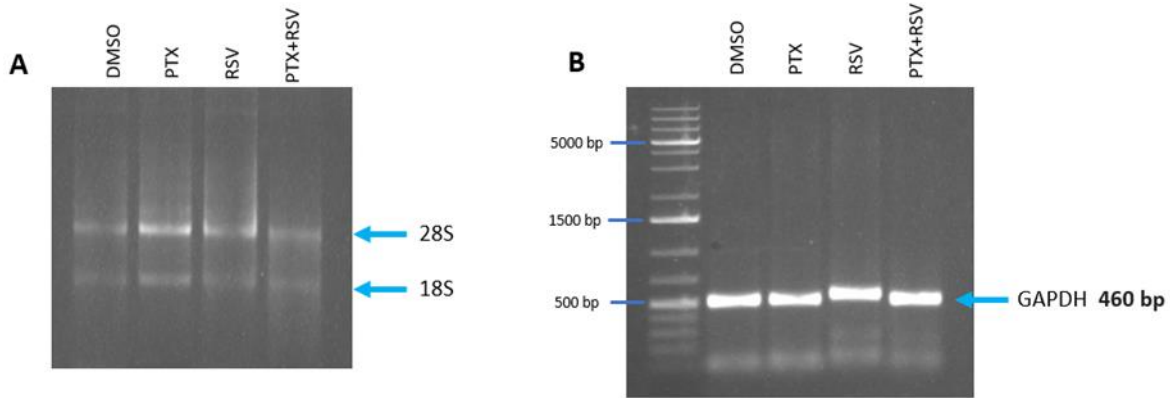


Figura 12. PCR en punto final de GAPDH. A) Imagen representativa de electroforesis de RNA total de células SKBR3 tratadas con DMSO; PTX (120 nM), RSV (150 uM) y PTX+RSV (120 nM, 150 uM) durante 6 hr en un gel de agarosa al 1.2%, se observan las subunidades ribosomales 28S y 18S. B) Imagen representativa de electroforesis del producto de PCR en punto final de GAPDH de las células SKBR3 tratadas con DMSO PTX (120 nM), RSV (150 uM) y PTX+RSV (120 nM, 150 uM) durante 6 hr.

Se realizó un PCR en punto final para GAPDH para verificar que la síntesis de cDNA se realizó correctamente (Figura 12B). Posteriormente, se realizó PCR en tiempo real (qPCR) para el gen constitutivo RPBL13A y los genes MALAT1 y Maspina quienes se han visto involucrados en la modulación de la metástasis. Una gráfica de la curva de amplificación es mostrada en la Figura 13, indicando como cada una de las muestras amplifica exponencialmente en cada ciclo hasta llegar a la fase de meseta. Para el análisis cuantitativo de expresión se obtuvo el valor de ciclo umbral (Ct) de cada muestra. Por otra parte, también se analizaron las curvas de disociación, en la cual esta graficada la fluorescencia con respecto al tiempo (dF/dT). La curva de disociación nos indica si el producto amplificado es el mismo en todas las muestras, pues al tener la misma temperatura de disociación solo se observará un solo pico, de tener más de un producto se observarían más de un pico los cuales corresponderían a diferentes temperaturas de disociación (Figura 14). Las curvas de disociación o temperatura melting es una estrategia utilizada cuando se realizan ensayos de qPCR con SYBR Green para confirmar que la fluorescencia es generada por la amplificación un solo producto.

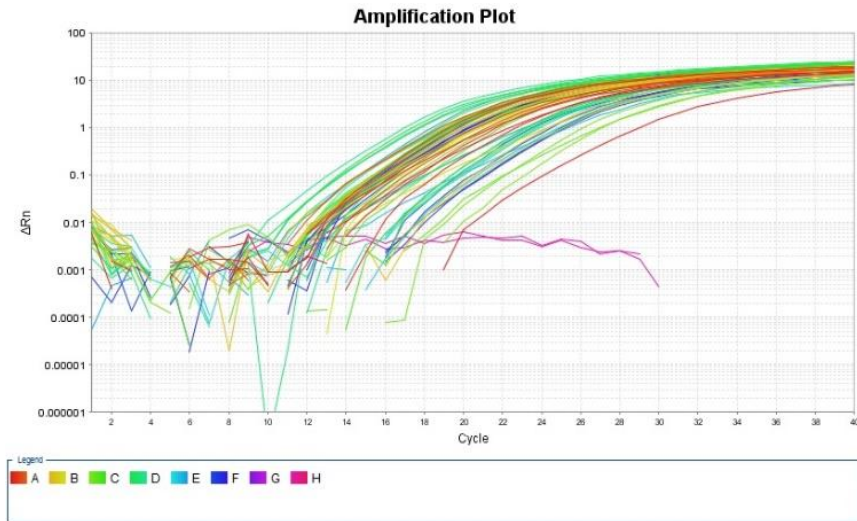


Figura 13. Curva de amplificación de RPBL13A. Curva de amplificación de un fragmento del gen RPBL13A de células SKBR3 tratadas con DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) durante 6hr y 12 hr. Se observa la amplificación exponencial de RPBL13A en las diferentes muestras. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el fluoróforo SYBR Green.

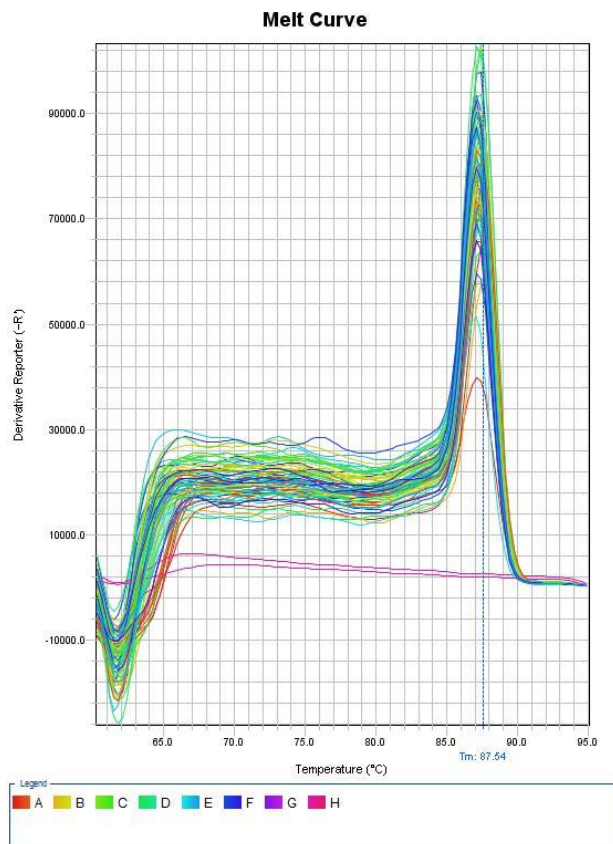


Figura 14. Curva de disociación del producto amplificado por qPCR del gen RPBL13A. Curva de disociación del producto amplificado del gen RPBL13A de células SKBR3 tratadas con DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) durante 6hr y 12 hr. En la gráfica se observa que la temperatura de disociación (87.5 grados) del producto amplificado es la misma, por lo cual todas las muestras tienen el mismo producto.

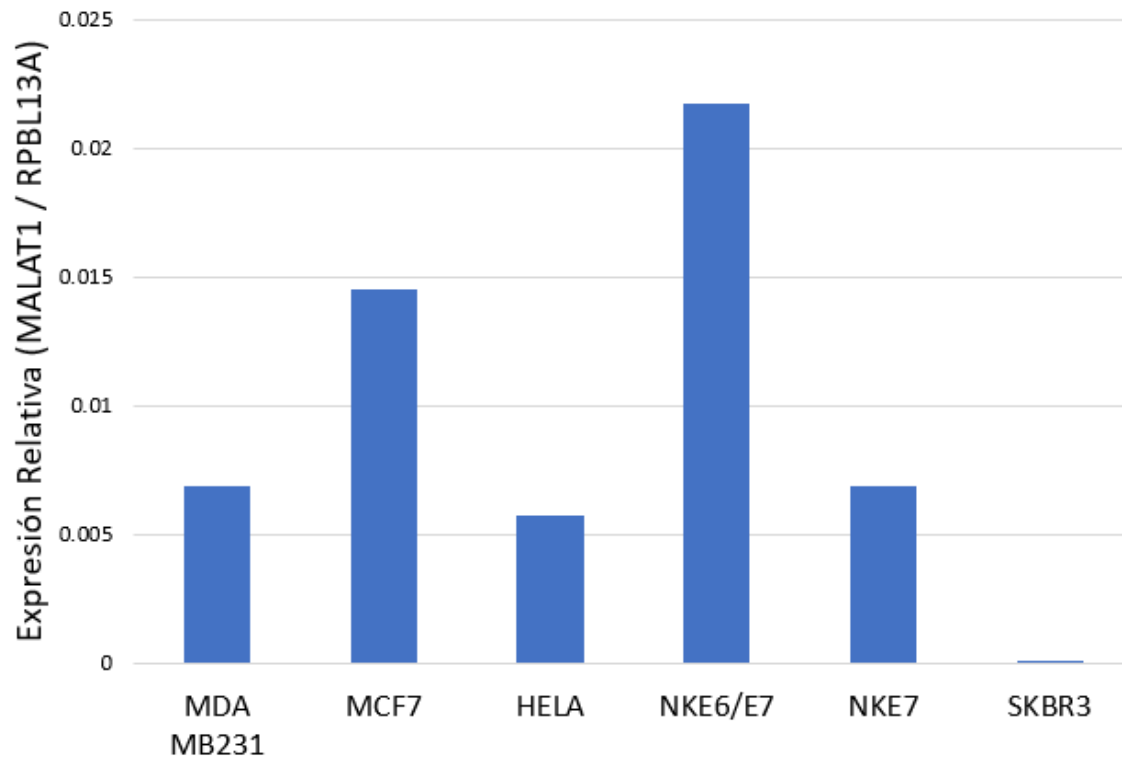


Figura 15. Expresión relativa de MALAT1 en diferentes líneas celulares. Se realizó qPCR utilizando como sonda a SYBR Green para amplificar un fragmento del gen de MALAT1 en diferentes líneas celulares. La gráfica muestra la expresión basal del RNA mensajero de MALAT1 en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7, HeLa, NK/E6/E7, NKE7 y SKBR3. Al no contar con un cultivo primario de células como calibrador, solo se aplicó la fórmula 2^{-DCt} .

MALAT1 suprime metástasis en CaMa, por lo cual se evaluó de forma exploratoria la expresión de MALAT1 en diferentes líneas celulares. Se encontró que las líneas celulares de queratinocitos que expresan a los oncogenes E6 y E7 del VPH16 (NKE6/E7) y MCF7 son las que expresan mayormente MALAT1, en cambio en la línea celular SKBR3 se observó una baja expresión de MALAT1 (Figura 15). Por otro lado, la ausencia de Maspina en CaMa es un indicador de progresión tumoral y potencial metastásico por lo cual se realizó el mismo ensayo exploratorio que con MALAT1. En el caso de Maspina, solo la línea celular NKE6/E7 presenta una mayor expresión de Maspina; SKBR3 presentó una muy baja expresión de Maspina (Figura 16).

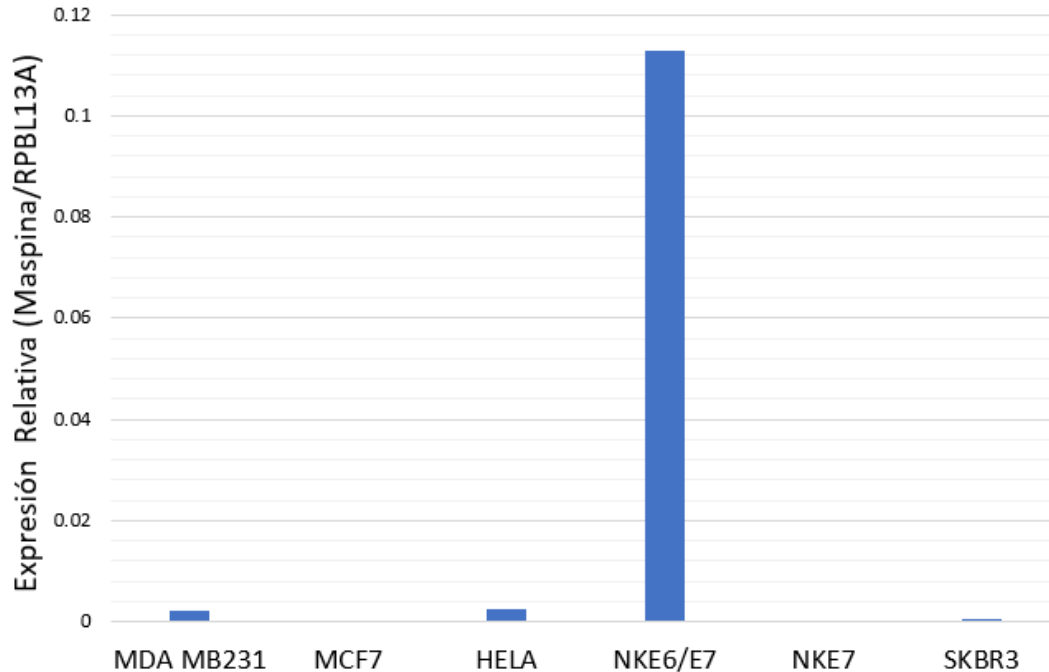


Figura 16. Expresión relativa de Maspina en diferentes líneas celulares. Se realizó qPCR utilizando como sonda a SYBR Green para amplificar un fragmento del gen de Maspina en diferentes tipos de líneas celulares. La gráfica muestra la expresión basal del RNA mensajero de Maspina en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7, HeLa, NK/E6/E7, NKE7 y SKBR3. Al no contar con un cultivo primario de células como calibrador, solo se aplicó la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Posterior a la evaluación de MALAT1 y Maspina en diferentes líneas celulares, se realizaron los ensayos de qPCR para las células SKBR3 tratadas con DMSO, Paclitaxel, Resveratrol y Paclitaxel+Resveratrol, a las 6 horas y 12 hr de tratamiento. Se utilizó el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para analizar los datos del qPCR, este método compara la expresión de $-\Delta Ct$ de nuestro gen de interés (MALAT1, Maspina) con la del gen constitutivo (RPBL13A); después compara la expresión de las muestras experimentales con los tratamientos contra el control con DMSO.

Los resultados encontrados muestran un aumento en la expresión de MALAT1 a las 6 y 12 horas con los tratamientos con Resveratrol, aunque esta expresión no fue estadísticamente significativa con respecto al control. De manera interesante, los tratamientos con Paclitaxel y Paclitaxel + Resveratrol mostraron una disminución del transcrito comparado con el control (Figura 17). En el caso de Maspina, no se observó expresión en los tratamientos de Paclitaxel, Resveratrol y Paclitaxel+Resveratrol a las 6 hr, al igual que para los tratamientos con DMSO, únicamente se observó expresión en los tratamientos a las 12 hr (Figura 18).

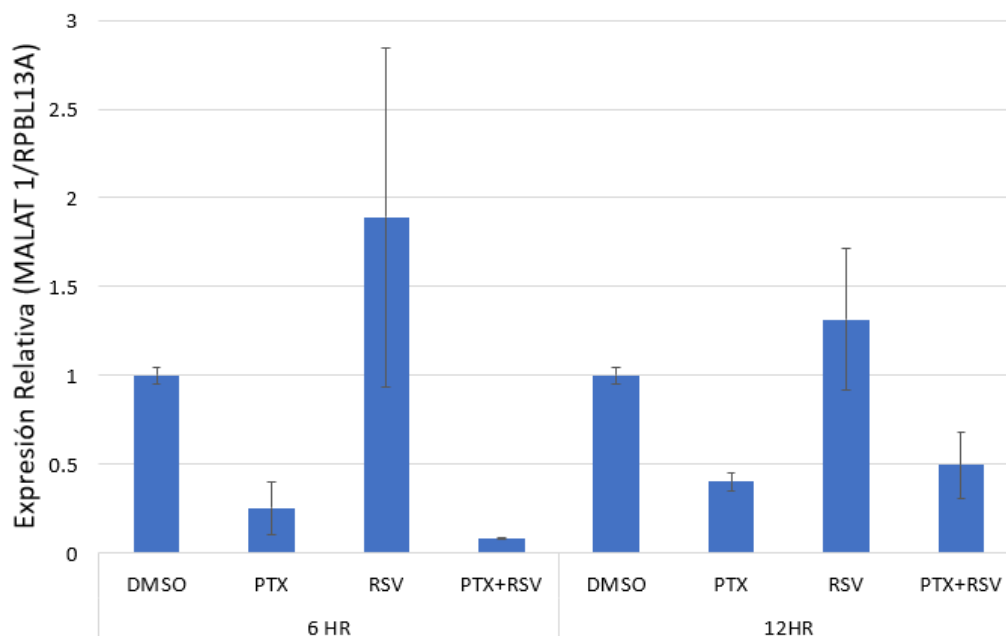


Figura 17. Expresión relativa de MALAT1. Se realizó qPCR para amplificar un fragmento del gen MALAT1 utilizando el cDNA de células SKBR3 tratadas con DMSO, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) a las 6 hr y 12 hr. Los resultados representan la expresión relativa de MALAT1 entre los diferentes tratamientos. Se realizaron 3 réplicas técnicas independientes.

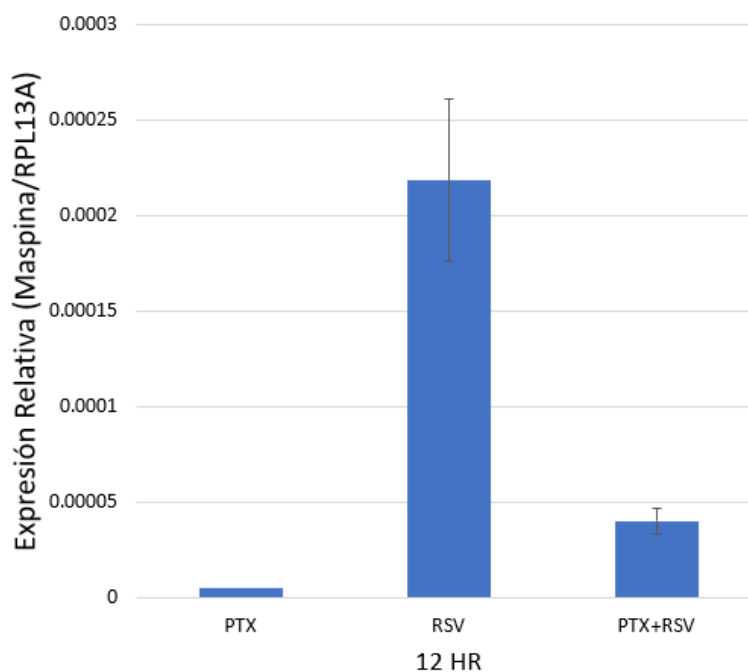


Figura 18. Expresión relativa de Maspina. Se realizó qPCR para amplificar un fragmento del gen Maspina utilizando el cDNA de células SKBR3 tratadas con, PTX (120 nM), RSV (150 μ M) y PTX+RSV (120 nM, 150 μ M) a las 12 hr. Los resultados representan la expresión de Maspina en los diferentes tratamientos.

9. DISCUSIÓN

CaMa es la principal muerte por neoplasia en mujeres. El subtipo HER2+ es uno de los subtipos más agresivos que genera quimioresistencia, por lo que es necesario realizar búsquedas alternativas de tratamiento.

En este proyecto se encontró que la IC50 para Paclitaxel fue de 120 nM a las 48 hr en la línea celular SKBR3 de CaMa (Subtipo HER2+). Li y colaboradores reportaron una IC50 de 1 uM en la línea celular MCF7 de CaMa (subtipo hormonal) (Li et al., 2020). Por otro lado, Zhang y colaboradores reportaron una inhibición de la proliferación de aproximadamente el 60% con concentraciones de 4 mM y 7 mM en la línea celular SKBR3 a las 24 hr (Y. Zhang et al., 2018). Los resultados de Li y col., son diferentes a los nuestros debido a que la línea celular de CaMa (MCF7) es de subtipo hormonal. En el caso del estudio de Zhang la concentración que utilizaron es mayor a la que se usó en el proyecto de tesis, podría ser debido a que en sus ensayos ellos evalúan el radio de inhibición de la proliferación.

Al realizar la combinación de tratamientos no se observó un efecto aditivo entre Paclitaxel y Resveratrol. Fukui y colaboradores encontraron resultados similares al combinar 50 nM de Paclitaxel y 40 uM de Resveratrol, sugiriendo que Resveratrol podría estar disminuyendo la actividad quimioterapéutica de Paclitaxel (Fukui et al., 2010).

Naderi y colaboradores analizaron el efecto de alantolactona en la línea celular de CaMa, MDA-MB 231. En este estudio se encontró que la inhibición de STAT3 por alantolactona promueve apoptosis e inhibe migración en células MDA-MB-231 derivadas de CaMa al reducir la expresión de N-cadherina y Vimentina. Los autores no realizaron ensayos de herida, ni ensayos de migración (Transwell) (Naderi et al., 2022). De manera similar, nosotros no realizamos estos ensayos; sin embargo, sí se evaluó la expresión del RNA largo no codificante MALAT1 y Maspina, genes importantes en la regulación de metástasis en cáncer.

Observamos un incremento de la expresión de MALAT1 en células SKBR3 tratadas con Resveratrol a las 6 hr y 12 hr, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo comparado con el grupo control. MALAT1 se ha descrito como promotor de metástasis en algunos tipos de cáncer; por ejemplo, cáncer de pulmón e hígado. Sin embargo, en un estudio realizado por Kim y colaboradores en el que utilizaron xenoinjertos, observaron que la sobreexpresión de MALAT1 inhibe metástasis, mientras que la baja expresión de MALAT1 induce metástasis en CaMa. Los autores encontraron que MALAT1 inhibe metástasis al secuestrar al factor de transcripción pro-metastásico TEAD (Kim et al., 2018). En otro estudio realizado por Kwok y colaboradores, de igual forma, encontraron que MALAT1 suprime migración e invasión en células SKBR3 (CaMa) y HCT116 y RKO (cáncer de colon). En este estudio, los autores identificaron 3 principales hallazgos: 1) las propiedades

supresoras de tumores por MALAT1; 2) la regulación de MALAT1 por PTEN de manera dependiente de miRNA; y 3) la regulación potencial de MALAT1 por genes que participan en la migración e invasión de células cancerosas, como EpCAM e ITGB4 (Kwok et al., 2018). Conforme a lo reportado en otros estudios, Resveratrol al aumentar la expresión de MALAT1 estaría inhibiendo la migración y metástasis de las células de CaMa, SKBR3.

En el caso de la expresión de Maspina, no se observó expresión basal en las células SKBR3, únicamente se encontró expresión en las células después del tratamiento con Paclitaxel, Resveratrol y Paclitaxel+Resveratrol a las 12 hr. Esto sugiere que la expresión de Maspina se incrementa después de las 12 hr de tratamiento con Resveratrol. Dos estudios independientes realizados por Dzinic y col., y Gao y col., demostraron que la pérdida homocigótica de la expresión de Maspina en ratones es embrionariamente letal (Dzinic et al., 2017; Gao et al., 2004). Bernardo y colaboradores, reportaron que Maspina inhibe la invasión de células de CaMa *in vitro* y bloquea metástasis tumoral *in vivo* (Bernardo et al., 2017). Además, los autores reportaron que la función colectiva de Maspina auxilia a diferenciar las células epiteliales, a organizar la polaridad y establecer interacciones célula – célula y célula – matriz. Por otro lado, Berardi y colaboradores, reportó que Maspina es la única serpina proapoptótica implicada en la regulación de la apoptosis en CaMa. La expresión de Maspina disminuye en estadios avanzados e invasivos de CaMa (Berardi et al., 2013). Además, dos estudios independientes realizados por Maass y col., y Stark y col., demostraron que la expresión de Maspina se reduce en los tumores primarios y en la metástasis (Maass et al., 2001; Stark et al., 2010). Estos datos reportados por otros autores, respaldan nuestros resultados al no encontrar expresión de manera basal de Maspina en la línea celular de CaMa, SKBR3. Al incrementar la expresión de Maspina posterior a 12 hr de tratamiento podría ser indicador de que Resveratrol promueve la expresión de Maspina. Una incubación de las células con un tiempo mayor de 12 hrs de tratamiento podría promover un incremento de expresión de Maspina.

Nosotros evaluamos la expresión de Maspina y MALAT1 como una medida indirecta de la supresión de la metástasis por los tratamientos. Sin embargo, ensayos adicionales son necesarios para demostrar la inhibición de migración e invasión de las células SKBR3 por los tratamientos utilizados.

10. CONCLUSIÓN

El uso individual de Resveratrol y Paclitaxel disminuyen la viabilidad celular de la línea celular SKBR3, mientras que la combinación de ambos fármacos no tuvo un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad.

Además, Resveratrol y Paclitaxel promovieron el aumento en la expresión del RNA mensajero de MALAT1 y Maspina, los cuales son genes que participan en la regulación de metástasis; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Es

rnecesario realizar ensayos adicionales para evaluar el potencial papel que tiene Resveratrol y Paclitaxel en la inhibición de invasión y migración.

11. PERSPECTIVAS

- * Realizar ensayo de cierre de herida en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel
- * Realizar ensayo de Transwell en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel.
- * Analizar la expresión del RNA mensajero de Maspina a las 18 y 24 hrs en células SKBR3 tratadas con Resveratrol y Paclitaxel

REFERENCIAS

- Abcam. (2022). *Metastasis involves the spread of cancer from the primary tumor to distant tissues and organs. Biomarkers of cancer metastasis.* https://www.abcam.com/cancer/biomarkers-of-cancer-metastasis?utm_content=1%7cNewsletter%7cText%7cCancer%7c&utm_source=Eloqua&utm_medium=Email&utm_campaign=Newsletter%7CAwareness%7C2021-09-19%2019%3A00%3A00.000%7CN%2FA%7CGLOBAL%7CEN%7CNewsletter%20-%20Global&mi_u=40400&elqst=272&elqsid=17495
- Albagoush, S., & Limaiem, F. (2021). HER2. En *Stat Pearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537134/>
- Alberts, B. (2017). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alqahtani, F. Y., Aleanizy, F. S., El Tahir, E., Alkahtani, H. M., & AlQuadeib, B. T. (2019). Paclitaxel. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 44, 205–238. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.001>
- American Cancer Society. (2019a, septiembre). *Etapas del cáncer de seno.* <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/etapas-del-cancer-de-seno.html>
- American Cancer Society. (2019b, septiembre). *Tipos de cáncer de seno.* <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/tipos-de-cancer-de-seno.html>
- American Society of Clinical Oncology, (ASCO). (2012, junio 21). *Cáncer de mama—Introducción.* Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%3%A1ncer/c%3%A1ncer-de-mama/introduccion>
- American Society of Clinical Oncology, (ASCO). (2017, julio 20). *Cáncer de mama metastásico—Tipos de tratamiento.* Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%3%A1ncer/c%3%A1ncer-de-mama-metast%3%A1sico/tipos-de-tratamiento>
- American Society of Clinical Oncology, (ASCO). (2019, marzo 1). *Estadios del cáncer.* Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%3%B3n-del-c%3%A1ncer/diagn%3%B3stico-de-c%3%A1ncer/estadios-del-c%3%A1ncer>
- American Society of Clinical Oncology, (ASCO). (2022, enero). *Cáncer de mama—Estadísticas.* Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%3%A1ncer/c%3%A1ncer-de-mama/estad%3%ADsticas>
- Ataseven, B., Gologan, D., Gunesch, A., Kehl, V., Hoegel, B., Beer, M., & Eiermann, W. (2012). HER2/neu, Topoisomerase 2a, Estrogen and Progesterone Receptors: Discordance between Primary Breast Cancer and Metastatic Axillary Lymph Node in Expression and

Amplification Characteristics. *Breast Care*, 7(6), 465–470.
<https://doi.org/10.1159/000345467>

Berardi, R., Morgese, F., Onofri, A., Mazzanti, P., Pistelli, M., Ballatore, Z., Savini, A., De Lisa, M., Caramanti, M., Rinaldi, S., Pagliaretta, S., Santoni, M., Pierantoni, C., & Cascinu, S. (2013). Role of maspin in cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 2, 8.
<https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-8>

Bernardi, M. A., Logullo, A. F., Pasini, F. S., Nonogaki, S., Blumke, C., Soares, F. A., & Brentani, M. M. (2012). Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoeexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncology Reports*, 27(1), 28–38.
<https://doi.org/10.3892/or.2011.1477>

Bernardo, M. M., Dzinic, S. H., Matta, M. J., Dean, I., Saker, L., & Sheng, S. (2017). The Opportunity of Precision Medicine for Breast Cancer with Context-Sensitive Tumor Suppressor Maspin. *Journal of cellular biochemistry*, 118(7), 1639–1647.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25969>

Bush, N. G., Evans-Roberts, K., & Maxwell, A. (2015). DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0010–2014. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2014>

Candanedo-González, F., & Pérez-Salazar, E. (2012). El papel de la progesterona en cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 11(3), 7.

CDC. (2021, septiembre 22). *¿Qué es el cáncer de mama?* Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>

Demoulin, B., Hermant, M., Castrogiovanni, C., Staudt, C., & Dumont, P. (2015). Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1156–1165. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.015>

Dzinic, S. H., Bernardo, M. M., Li, X., Fernandez-Valdivia, R., Ho, Y.-S., Mi, Q.-S., Bandyopadhyay, S., Lonardo, F., Vranic, S., Oliveira, D. S. M., Bonfil, R. D., Dyson, G., Chen, K., Omerovic, A., Sheng, X., Han, X., Wu, D., Bi, X., Cabaravdic, D., ... Sheng, S. (2017). An essential role of maspin in embryogenesis and tumor suppression. *Cancer research*, 77(4), 886–896. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2219>

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>

Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(3), 3–23. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>

Fukui, M., Yamabe, N., & Zhu, B. T. (2010). Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 46(10), 1882–1891. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.004>

Gao, F., Shi, H. Y., Daughy, C., Cella, N., & Zhang, M. (2004). Maspin plays an essential role in early embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 131(7), 1479–1489. <https://doi.org/10.1242/dev.01048>

Goulet, B., Kennette, W., Ablack, A., Postenka, C. O., Hague, M. N., Mymryk, J. S., Tuck, A. B., Giguère, V., Chambers, A. F., & Lewis, J. D. (2011). Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. *Laboratory Investigation*, 91(8), 1181–1187. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.66>

Goutsouliak, K., Veeraraghavan, J., Sethunath, V., De Angelis, C., Osborne, C. K., Rimawi, M. F., & Schiff, R. (2020). Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(4), 233–250. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0299-9>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Hart, V., Gautrey, H., Kirby, J., & Tyson-Capper, A. (2020). HER2 splice variants in breast cancer: Investigating their impact on diagnosis and treatment outcomes. *Oncotarget*, 11(46), 4338–4357. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27789>

Huh, H. D., Kim, D. H., Jeong, H.-S., & Park, H. W. (2019). Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells*, 8(6), 600. <https://doi.org/10.3390/cells8060600>

IMSS. (2017). *Tratamiento del cancer de mama en segundo y tercer nivel de atención*. Instituto Mexicano del Seguro Socia. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc> <http://www.cenetec.salud.gob.mx/contenidos/gpc/catalogoMaestroGPC.html>

INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA* (Num. 571/21) [COMUNICADO DE PRENSA]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Jacot, W., Fiche, M., Zaman, K., Wolfer, A., & Lamy, P.-J. (2013). The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1836*(1), 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.004>

Kim, J., Piao, H.-L., Kim, B.-J., Yao, F., Han, Z., Wang, Y., Xiao, Z., Siverly, A. N., Lawhon, S. E., Ton, B. N., Lee, H., Zhou, Z., Gan, B., Nakagawa, S., Ellis, M. J., Liang, H., Hung, M.-C., You, M. J., Sun, Y., & Ma, L. (2018). Long non-coding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nature genetics*, *50*(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0252-3>

Kumar, A., Golani, A., & Kumar, L. D. (2020). EMT in breast cancer metastasis: An interplay of microRNAs, signaling pathways and circulating tumor cells. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *25*(5), 979–1010. <https://doi.org/10.2741/4844>

Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *293*(2), 247–269. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>

Kwok, Z. H., Roche, V., Chew, X. H., Fadieieva, A., & Tay, Y. (2018). A non-canonical tumor suppressive role for the long non-coding RNA MALAT1 in colon and breast cancers. *International Journal of Cancer*, *143*(3), 668–678. <https://doi.org/10.1002/ijc.31386>

Lamb, C. A., Vanzulli, S. I., & Lanari, C. (2019). Hormone receptors in breast cancer: More than estrogen receptors. *Medicina*, *79*(Spec 6/1), 540–545.

Lee, J. H., Wendorff, T. J., & Berger, J. M. (2017). Resveratrol: A novel type of topoisomerase II inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(51), 21011–21022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810580>

Leone, S., Cornetta, T., Basso, E., & Cozzi, R. (2010). Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction. *Cancer Letters*, *295*(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.02.022>

Li, G., Xu, D., Sun, J., Zhao, S., & Zheng, D. (2020). Paclitaxel inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by blocking activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, *29*(11), 1337–1345. <https://doi.org/10.17219/acem/127681>

Li, Z.-X., Zhu, Q.-N., Zhang, H.-B., Hu, Y., Wang, G., & Zhu, Y.-S. (2018). MALAT1: A potential biomarker in cancer. *Cancer Management and Research*, *10*, 6757–6768. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S169406>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *Lancet (London, England)*, 389(10087), 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5)
- Maass, N., Hojo, T., Rösel, F., Ikeda, T., Jonat, W., & Nagasaki, K. (2001). Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clinical Biochemistry*, 34(4), 303–307. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(01\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(01)00220-X)
- Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., & Rodríguez-Cuevas, S. (2017). Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cirugía y Cirujanos*, 85(3), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.08.004>
- Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), 872–891. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.005>
- Marupudi, N. I., Han, J. E., Li, K. W., Renard, V. M., Tyler, B. M., & Brem, H. (2007). Paclitaxel: A review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opinion on Drug Safety*, 6(5), 609–621. <https://doi.org/10.1517/14740338.6.5.609>
- Naderi, R., Gholizadeh-Ghaleh Aziz, S., & Haghigi-Asl, A. S. (2022). Evaluating the effect of Alantolactone on the expression of N-cadherin and Vimentin genes effective in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Annals of Medicine and Surgery*, 73, 103240. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.103240>
- Olivas-Menayo. (2017, diciembre). *Anatomía de la mama | Glándula, complejo areola-pepón, Cooper, lóbulo*. Cirugías de la mama. <https://www.cirugiasdelamama.com/anatomia-de-la-mama>
- Pemberton, P. A., Tipton, A. R., Pavloff, N., Smith, J., Erickson, J. R., Mouchabeck, Z. M., & Kiefer, M. C. (1997). Maspin Is an Intracellular Serpin That Partitions into Secretory Vesicles and Is Present at the Cell Surface. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(12), 1697–1706. <https://doi.org/10.1177/002215549704501213>
- Pommier, Y., Nussenzweig, A., Takeda, S., & Austin, C. (2022). Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(6), 407–427. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00452-3>
- Poorolajal, J., Heidarimoghis, F., Karami, M., Cheraghi, Z., Gohari-Ensaf, F., Shahbazi, F., Zareie, B., Ameri, P., & Sahraei, F. (2021). Factors for the Primary Prevention of Breast

Cancer: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Journal of Research in Health Sciences*, 21(3), e00520. <https://doi.org/10.34172/jrhs.2021.57>

Royfman, R., Whiteley, E., Noe, O., Morand, S., Creeden, J., Stanbery, L., Hamouda, D., & Nemunaitis, J. (2021). BRCA1/2 signaling and homologous recombination deficiency in breast and ovarian cancer. *Future Oncology (London, England)*, 17(21), 2817–2830. <https://doi.org/10.2217/fon-2021-0072>

Santaballa B, A. (2020, febrero). *Cáncer de mama*. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama>

Sato, S., & Itamochi, H. (2012). Bevacizumab and ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 24(1), 8–13. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32834daeed>

Stark, A. M., Schem, C., Maass, N., Hugo, H. H., Jonat, W., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2010). Expression of metastasis suppressor gene maspin is reduced in breast cancer brain metastases and correlates with the estrogen receptor status. *Neurological Research*, 32(3), 303–308. <https://doi.org/10.1179/016164109X12518779082192>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tan, K. B., Dorman, T. E., Falls, K. M., Chung, T. D., Mirabelli, C. K., Crooke, S. T., & Mao, J. (1992). Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: Characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. *Cancer Research*, 52(1), 231–234.

Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K., Sanchez-Dominguez, C. N., Cardona-Huerta, S., Muñoz-Maldonado, G. E., Ruiz-Flores, P., Barcenas-Walls, J. R., Osuna-Rosales, L. E., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J. F., Valero-Gomez, J., Gomez-Macias, G. S., Barbosa-Quintana, A., Barboza-Quintana, O., Garza-Guajardo, R., & Ortiz-Lopez, R. (2019). Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from Northeastern Mexico. *Oncology Letters*, 17(3), 3581–3588. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9984>

Villarreal-Garza, C., Aguila, C., Magallanes-Hoyos, M. C., Mohar, A., Bargalló, E., Meneses, A., Cazap, E., Gomez, H., López-Carrillo, L., Chávarri-Guerra, Y., Murillo, R., & Barrios, C. (2013). Breast Cancer in Young Women in Latin America: An Unmet, Growing Burden. *The Oncologist*, 18(12), 1298–1306. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0321>

Wordeman, L., & Vicente, J. J. (2021). Microtubule Targeting Agents in Disease: Classic Drugs, Novel Roles. *Cancers*, 13(22), 5650. <https://doi.org/10.3390/cancers13225650>

World Health Organization. (2022a). *Cancer*. <https://www.who.int/health-topics/cancer>

World Health Organization. (2022b). *Cáncer de mama*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

Yeeravalli, R., & Das, A. (2021). Molecular mediators of breast cancer metastasis. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 14(4), 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2021.02.002>

Zhang, W., Shi, H. Y., & Zhang, M. (2005). Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. *BMC Cancer*, 5, 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-50>

Zhang, Y., Wang, Y., & Xue, J. (2018). Paclitaxel inhibits breast cancer metastasis via suppression of Aurora kinase-mediated cofilin-1 activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 1269–1276. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5588>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS DE APROBATORIOS



**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. VILLARREAL MIRANDA LUZ ELENA** con número de matrícula **10018646** cuyo título es:

“Inhibición de la actividad de TOP2a y su efecto en la expresión de dos genes asociados con metástasis en la línea celular de CaMa, SKBR3 tratadas por paclitaxel”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 18 de abril de 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN	(PRESIDENTE).
DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE	(SECRETARIO).
DR. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ	(VOCAL).
DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE	(SUPLENTE).
DRA. JISELA DIMAS GONZÁLEZ	(SUPLENTE)

MIE/VRRC/eae



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo certificados.titulacionesiicba@uaem.edu.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-04-18 14:03:45 | FIRMANTE

uRraTQfyrDKYIDxfvKf61NWN5Uuloc6Rsh2HiZ/myLi2X+QG8yrVup3cCRx54XD9jx9uTRpw5oJJFW5Qr6HPGwVMFXitPPme1QVW073sUNtrXMI00C47Viv7IBVg6ftzte8oe1z8ZN84y98avG7ao+JFUfMi4d3yu57EF2XgoRqSBnqYoeggJ5x5MU9JoW2akuiL29MwpO1lvB8GrGZaELEAuQFxA1DRf4qZQg3WDIRCLmOhgYhgBD1tpch+ilbdhlgfVZZBT8ENeQ3O6otbNQcmd6UyKzDk9mK4+IBShNTVwi0c5z1HtYf9XArQm7ZRcV9qVqLsiPBHmYBHt5w==

ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ | Fecha:2024-04-18 16:05:52 | FIRMANTE

aWR28Keier9PAiTuu2IIQJfXDL78Qb157K5MLCxeG5toZyijlfe0tr5vqcSOFioDVkCvcyi4e//YGmdOcSjibEMN+UykTw6+ABh6hbf16Fmw0bNlagNVialsSrDsP9glK4CM4kxd4XGxRxoYO6io84A6xVRWmsVyXgEX5qQ0qFpYcAaSn/LKyR5ypUOa2cblyzNiRu5oTidMI/J3/hxgSHdNaVAwo2zLwWgkptUwG24pbVwiMJ7OxQkBdmUczXK0Kb07QV37n8+pZb9czbW6fqk9Wj1i19DoHGfXQk09gW3S4jfiHGr3PoKIUh1hUM4qrOnNm2KgtJ6S3rxwQ==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2024-04-18 17:05:46 | FIRMANTE

ugyfAiJud9OTt7ktPdJyp4ai8nEvxtySgR5dGdR0PxiFqRAflaQV98Zu7Ti2ZP7PYAu+bAwDGArBEJAie9yLzsUdq6Zpek6DZZqtXdSn9+9dBVeW2lnw/ziictF5u+20+O7+245TIGPcyOK+fRgFvjCCi8/2HMOAEMRRIP6oM57TpL+sQ18Qn/yIVyxZ1hdPZIK9pl19XC0KUdLjY9m7840HmXSAouvHh6O+BlyQRDJW6p1B8QCUCOu0q2m+wVPkzDtuzcEJ2xN/WsxX5RqbePmWJppezY+0QgVjiue1dJ4DE1UTKQeS1I5109o+KocJzAXxPeq3CWdfcaBEKA==

JISELA DIMAS GONZÁLEZ | Fecha:2024-04-18 18:01:31 | FIRMANTE

XQqgrk2k+qppHatyC2hlz9r6PnjHvwK8O5RcW3pmiqBr7Im5bKMjG1VsaDQmhsZpGvPvLWd4OZu6yAILK+k2ftlP+LSmXdDqTFwNtXyTQloGZBfngWGD7nM+WyeWysiy9X3nJThU9Ame1D14+lw/yQsr4tZNOfrFwG676ynipgJUDMMMKUulmHge2Ub+M2XKUj0SxDbJFE+1XKKQ/9sDbfBEc/wGmZoeEYEHfzvKRP36i66q9SMHLLybybKXoKkWjI7qfeOP2Xs3DxqbpzrimiuZ2nKx9WTOicGHIWDPiVw00xTjy9FAT5y6Hv8xEOGx2CcZiGX1j/hJ3hDN08yoA==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2024-04-19 11:25:42 | FIRMANTE

ZVSf3zpJ7p4dhRWyCztD0zuxio03E6OSAoc9ObrsyT8KjldFgQaWqzcB39e0FIB0TPm1ZKcWZkJlt1S+GWxJvd/JXAGu8HuG07GPEvtf9NrY2mUy67wqChYQOM1MDYhJxn0yf0Cvg+xlH4M5o3+aeNRloWTdAFq70uOhna3TECL5MXltdDnZrb06s5SylA0WxJO/nqmFNRG5lytm2fC6njFfyvYM2oYw9HJYGxqMRpbrR+0XzP4gPZ+uMfNMedlxuO1HTF9iP43tX2WnJCT3loR+/P6Vh4w5ybb3YsnE1m2ujCKiRYod6ZwQlHhrHSW9CKg0Hz0bRjH7zgtW==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



wIbRd9M7k

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aWH5rciHp35VxkvuTDayn04uzWq0yXoe>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029