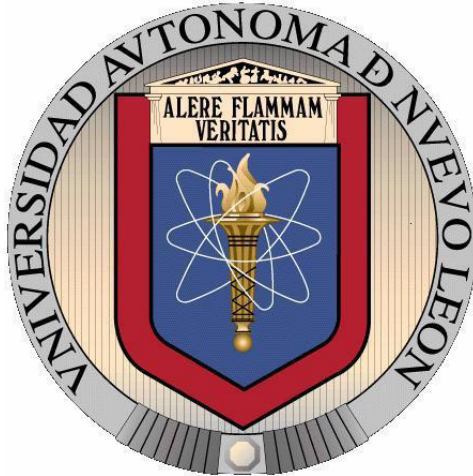


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES GENES BLANCO DE FOXC1 EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

PRESENTA

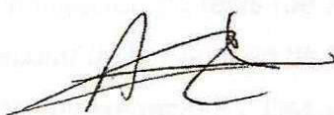
QBP. ANA VICTORIA CAMERO MALDONADO

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

AGOSTO, 2017

**IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES GENES BLANCO DE FOXC1 EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis



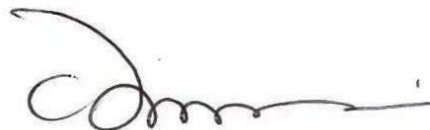
Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez

Co-Director de Tesis



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar mi posgrado.

A la Dra. Rocío Ortiz López por su confianza para realizar este proyecto, por su apoyo a pesar de todas las dificultades, sus consejos y todo el conocimiento dado. Muchas gracias.

Al Dr. Alberto Camacho Morales por su apoyo, su disponibilidad para ayudarme, su amabilidad y motivación. Muchas gracias.

Al Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez y a la Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret por su apoyo y consejos brindados.

A la Dra. Sandra Karina Santuario Facio, gracias Sandra por apoyarme siempre que lo necesite, por trasmitirme tus conocimientos y ser tan paciente, por la amistad brindada.

A Bianka Camacho por ser mi compañera en esta aventura que fue realizar este proyecto, por darme tu amistad, porque a pesar de las dificultades trabajar con amigos lo hace todo más sencillo y divertido. Gracias por tu apoyo y paciencia cuando más lo necesité.

A mis compañeros de la Unidad de Genómica del CIDICS: Bianka, Maribel, Sandra, Liz, Geo, Adriana, Laura, José Ramón, Ernesto, Claudia, Grecia y a la Química Paty por su apoyo, sus consejos, por trasmitirme sus conocimientos y dejarme formar parte del laboratorio.

DEDICATORIA

A Dios porque sé que nunca me sueltas de tu mano y porque tus tiempos son perfectos, por permitirme llegar a cumplir esta meta.

A mi madre especialmente, por tu ejemplo de fortaleza que siempre me has brindado y del cual he aprendido mucho. Gracias por siempre estar ahí cuando más lo necesito, por creer en mí y apoyarme en todo incondicionalmente. Simplemente te debo todo lo que soy, espero algún día recompensar algo de lo mucho que me has dado. Este logro también es tuyo.

A mi familia, mi abuelo, mis tíos y primos, por estar pendientes de mí, por su cariño, apoyo e inmensa paciencia.

A Jovani por apoyarme para seguir superándome profesionalmente y por acompañarme sobre todo en la etapa final de mayor dificultad.

Con amor

Ana

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLA DE CONTENIDO | I |
| LISTA DE FIGURAS | IV |
| LISTA DE TABLAS | V |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VI |
| RESUMEN | 1 |
| CAPÍTULO 1 | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| CAPÍTULO 2 | 3 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 PANORAMA DEL CÁNCER DE MAMA | 3 |
| 2.2 SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA | 3 |
| 2.2.1 CÁNCER DE MAMA DE SUBTIPO BASAL | 4 |
| 2.3 ANTECEDENTE DEL GRUPO DE TRABAJO | 6 |
| 2.4 GEN FOXC1 (Forkhead box C1) | 7 |
| 2.5 PAPEL DEL GEN FOXC1 EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA | 8 |
| 2.6 IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE FOXC1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA | 9 |
| 2.7 BLANCOS MOLECULARES DE FOXC1 EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA | 10 |
| CAPÍTULO 3 | 12 |
| JUSTIFICACIÓN | 12 |
| CAPÍTULO 4 | 13 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 13 |
| CAPÍTULO 5 | 13 |
| HIPÓTESIS | 13 |
| CAPÍTULO 6 | 13 |
| OBJETIVOS | 13 |
| OBJETIVO GENERAL | 13 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| CAPÍTULO 7 | 14 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 7.1 - Estrategia general | 14 |
| 7.2 Cultivo celular | 14 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.3 Silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 y análisis de su efecto en la expresión global | 15 |
| 7.3.1. Selección de la densidad celular | 15 |
| 7.3.2 Selección del agente transfectante | 15 |
| 7.3.4 Ensayo de silenciamiento de FOXC1 | 18 |
| 7.4 Sobreexpresión transitoria de FOXC1 en la línea HCC1395 y análisis de su efecto en la expresión global | 18 |
| 7.4.1 Sobreexpresión transitoria de FOXC1 | 18 |
| 7.5 Análisis de expresión global mediante microarreglos | 20 |
| 7.6 Análisis in silico de los promotores génicos identificados en los ensayos de silenciamiento y sobreexpresión | 21 |
| CAPÍTULO 8 | 22 |
| RESULTADOS | 22 |
| 8.1 Silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 y análisis de su efecto en la expresión global | 22 |
| 8.1.3 Análisis de expresión global mediante microarreglos | 25 |
| 8.2 Sobreexpresión transitoria de FOXC1 en la línea HCC1395 y análisis de su efecto en la expresión global | 28 |
| 8.2.3 Análisis de expresión global mediante microarreglos | 32 |
| 8.3 Análisis in silico de los promotores de los genes identificados durante los protocolos de silenciamiento y sobreexpresión | 34 |
| CAPÍTULO 9 | |
| DISCUSIÓN | 39 |
| CAPÍTULO 10 | 45 |
| CONCLUSIÓN | 45 |
| CAPÍTULO 11 | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |
| ANEXO 1 | |
| Silenciamiento de FOXC1 con el Kit Silencer® siRNA Transfection II (Cat# AM1631, Ambion) | 50 |
| ANEXO 2 | |
| Extracción de RNA total con PureZOL™ (Bio-Rad) | 51 |
| ANEXO 3 | |
| Purificación del RNA en columna con el kit "RNeasy MinElute cleanup kit (50) Qiagen" Cat. 74204 | 52 |
| ANEXO 4 | |
| Transformación de células competentes | 53 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ANEXO 5 | |
| “Purificación de DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep Qiagen” Cat. 27104 | 55 |
| ANEXO 6 | |
| Sobreexpresión de FOXC1 con el Kit Xfect™ Single Shots (Midi) Protocol-At-A- Glance (Clontech) | 55 |
| ANEXO 7 | |
| Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit | 56 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Firma de 40 genes asociados con el fenotipo de CMTN.

Figura 2. Elemento conservado en los promotores de genes blanco de FOXC1.

Figura 3. Expresión de FOXC1 en siete líneas celulares de cáncer de mama.

Figura 4. Vector de expresión que incluye clonada la secuencia de FOXC1, un promotor de CMV, como gen reportero GFP y resistencia a ampicilina.

Figura 5. Estandarización del silenciamiento de FOXC1.

Figura 6. Ensayo de silenciamiento final de FOXC1.

Figura 8. Genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDA-MB-231.

Figura 9. Clasificación en PANTHER de los genes afectados por el silenciamiento de FOXC1.

Figura 10. Estandarización de la sobreexpresión de FOXC1.

Figura 11. Ensayo de sobreexpresión final de FOXC1.

Figura 12. Evaluación de la integridad del RNA.

Figura 13. Genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1 en la línea celular HCC1395.

Figura 14. Clasificación en PANTHER de los genes afectados por la sobreexpresión de FOXC1.

Figura 15. Red de interacciones predicha en STRING de los genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1.

Figura 16. Red de interacciones predicha en STRING de los genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1.

Figura 17. Genes asociados al silenciamiento de FOXC1 y microambiente inflamatorio del tumor.

Figura 18. Funciones de CXCR4 / CXCL12 en NSCLC potencialmente reguladas por FOXC1 que impulsan la metástasis en cáncer de mama.

Figura 19. Rol de MDM2 y FNDC3B.

Figura 20. Rol de HIBCH.

LISTA DE TABLAS

Tabla.1 Clasificación del cáncer de mama

Tabla 2. Reacción para la síntesis de cDNA.

Tabla 3. Sondas TaqMan.

Tabla 4. Reacción general de PCR para 1 reacción.

Tabla 5. Programa general de amplificación.

Tabla 6. Rendimientos de RNA de la estandarización del silenciamiento de FOXC1.

Tabla 7. Rendimientos de RNA del ensayo final del silenciamiento de FOXC1.

Tabla 8. Genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDA-MB-231.

Tabla 9. Rendimientos de RNA de la estandarización de la sobreexpresión de FOXC1.

Tabla 10. Rendimientos de RNA del ensayo final de sobreexpresión de FOXC1.

Tabla 11. Genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1 en la línea celular HCC1395.

Tabla 12. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en MatInspector.

Tabla 13. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en PATCH.

Tabla 14. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en JASPAR.

Tabla 15. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en MatInspector.

Tabla 16. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en PATCH.

Tabla 17. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en JASPAR.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| g | Gravedades |
| BLBC | cáncer de mama de subtipo basal |
| cDNA | DNA complementario |
| CMNTN | cáncer de mama no triple negativo |
| CMTN | cáncer de mama triple negativo |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DMEM | Medio Eagle Modificado de Dulbecco |
| ER | Receptor de estrógenos |
| <i>et al.</i> | En latín, " <i>et alia</i> ", y otros |
| FOXC1 | Forkhead box C1 |
| HCC1395 | Células de carcinoma ductal primario |
| HER2 | receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano |
| HT-29 | Células de cáncer de colon |
| LB | Medio Luria Bertani |
| MDA-MB-231 | Células de adenocarcinoma metastásico |
| mg | Microgramos |
| mL | Mililitro |
| uL | Microlitro |
| mRNA | RNA mensajero |
| nm | Nanómetros |
| pb | Pares de bases nucleotídicas |
| PR | Receptor de progesterona |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SiRNA | Small interfering RNA |

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES GENES BLANCO DE FOXC1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: FOXC1 es un factor de transcripción que se une a una secuencia core de 9 pb 5'-GTAAA(A/T/C)(A/T/G)-3', participa en el desarrollo embrionario y estimula la proliferación de células de cáncer humanas. Se ha demostrado la sobreexpresión de FOXC1 en cáncer de mama en especial en el subtipo basal (BLBC), en lesiones metastásicas y en pacientes con mal pronóstico. Sin embargo, no se conoce cuál es el efecto de FOXC1 en el BLBC a través de los genes que regula y las vías de señalización en las que participa. **OBJETIVO:** Realizar el silenciamiento o la sobreexpresión del factor de transcripción FOXC1 para determinar sus posibles genes blanco y su participación en el desarrollo neoplásico de mama. **MATERIALES Y MÉTODOS:** FOXC1 se silenció en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo metastásico que sobreexpresa FOXC1, utilizando un siRNA pre-diseñado y el kit Silencer siRNA Transfection II (Ambion). Por otro lado, FOXC1 se sobreexpresó en la línea HCC1395 de cáncer de mama triple negativo primario que subexpresa FOXC1. Se aisló el RNA total, se cuantificó y se verificó su integridad, se comprobó el silenciamiento o sobreexpresión mediante qPCR. Se analizó el perfil de expresión utilizando microarreglos U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Para el análisis de los datos y determinar genes diferencialmente expresados se utilizó el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix. Se realizó un análisis en Panther para determinar funciones moleculares, procesos biológicos y vías de señalización. Se realizó una búsqueda en los promotores de los genes de sitios de unión a FOXC1 en tres programas o software: MatInspector (Genomatix), PATCH (Pattern Search For Transcription Factor Biding Sites) y JASPAR (2016). Finalmente, ya que se determinaron posibles genes blanco de FOXC1, se realizó un análisis de interacciones de todos los genes diferencialmente expresados tanto del silenciamiento como de la sobreexpresión de FOXC1 y se señalaron nuevas interacciones predichas *in silico*. **RESULTADOS Y CONCLUSIONES:** Identificamos al menos 56 genes regulados por FOXC1 y al menos 11 genes (CCL20, CXCL3, ADAM10 y KDR, GRK6, REL, MARCKS, MALAT1, HIBCH, FNDC3B y MDM2) potencialmente blanco de FOXC1, que participan en la inflamación, en el crecimiento de las células tumorales, en la invasión y la metástasis, en la producción de energía, la transición epitelio-mesenquimal e importantemente en la evasión de la apoptosis, promoviendo la progresión del cáncer.

Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo, con un estimado de 1,7 millones de casos y 521.900 muertes en 2012 (GLOBOCAN 2012). En México es desde el 2006 la primera causa de muerte por cáncer en la mujer y cada año presenta aproximadamente 20,444 casos (SSA, 2015).

En el 2015, Santuario-Facio y colaboradores analizaron el perfil de expresión de biopsias de cáncer de mama triple negativo (CMTN) frente a biopsias de cáncer de mama no triple negativo (CMNTN) en una población del noroeste de México. El análisis por microarreglos arrojó una firma de 40 genes asociados al fenotipo de CMTN, de los cuales 9 genes mostraron sobreexpresión significativa y se encuentran relacionados al metabolismo de insulina y de esfingolípidos. De interés, el gen que exhibió la mayor sobreexpresión corresponde al factor de transcripción FOXC1 (Santuario-Facio S., et al., 2017).

FOXC1 pertenece a la familia de factores de transcripción Forkhead box que se caracterizan por presentar un dominio común (dominio Forkhead) de 110-aminoácidos que se une al DNA para activar genes blanco. FOXC1 modula el desarrollo embrionario. Además, está implicado en la transición epitelio mesenquimal e, importante para el presente proyecto, FOXC1 se ha encontrado sobreexpresado en diferentes cánceres, entre ellos el cáncer de mama, y se ha demostrado su sobreexpresión en el subtipo de cáncer de mama basal (la mayoría triple negativo), en lesiones metastásicas y en pacientes con peor pronóstico. A la fecha, se conocen los genes blanco del factor FOXC1 en tejido sano de ojo (Tamimi Y et al., 2004) y en cáncer gástrico (Xu G et al., 2016), sin embargo, se desconocen los blancos moleculares que están asociados al cáncer de mama que nos den información para definir la acción de FOXC1 como tejido específico.

Por otro lado, se desconocen también los genes que coordinan la expresión y/o activación de FOXC1 que determine la conducta agresiva del cáncer de mama. En este contexto, es de nuestro interés identificar los genes blanco activados por FOXC1 y su potencial participación en el metabolismo tumoral del cáncer de mama triple negativo, que presenta fenotipos más agresivos y metastásicos.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

2.1 PANORAMA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el cáncer más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo, con aproximadamente 1,7 millones de casos y 521,900 muertes en 2012. Además, el cáncer de mama representa aproximadamente el 25% de todos los casos de cáncer y el 15% de todas las muertes relacionadas con cánceres en las mujeres (GLOBOCAN 2012; Torre LA, et al., 2015).

En México a partir del año 2006, el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico uterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres (SSA, 2015). Específicamente, en el año 2013 se registraron 5,405 defunciones en mujeres, con una tasa de 16.3 defunciones por cada 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama fueron Coahuila, Sonora y Nuevo León (SSA, 2015). Cabe señalar que las tasas de mortalidad para el cáncer de mama se incrementan conforme aumenta la edad y las muertes se deben principalmente a la metástasis a distancia, que se localizan en los huesos, el hígado, los pulmones y el cerebro (Wang J et al., 2012).

2.2 SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA

Los diferentes subtipos de cáncer de mama están estrechamente relacionados entre ellos, sin embargo, se han identificado biomarcadores que permite realizar subgrupos de este tipo de cáncer, mediante el uso de inmunohistoquímica y clasificación molecular. Se han identificado diferentes subtipos dependiendo de la expresión de los marcadores de receptores de estrógeno (ER), de progesterona (PR), y el receptor 2 del factor de crecimiento

epidérmico humano (HER2) (Tabla 1). El subtipo que no tiene ninguno de los receptores mencionados se considera triple negativo. Cada uno de estos subtipos tiene implicaciones clínicas específicas, por ejemplo, los subtipos de cáncer de mama luminales y HER2 pueden guiar su tratamiento, ya que a pacientes positivos para ER y PR se les puede dar terapia hormonal basada en tamoxifeno y a los pacientes con tumores HER2 (+) terapia específica empleando trastuzumab (Ray PS, et al., 2012; Zuo HD y Yao WW, 2016).

Tabla.1 Clasificación del cáncer de mama

| Subtipo | Inmunoperfil |
|-------------------------|-------------------|
| Luminal A | ER+, PR+/-, HER1- |
| Luminal B | ER+, PR+/-, HER2+ |
| Basal (Triple negativo) | ER-, PR-, HER2- |
| HER2 amplificado | ER-, PR-, HER2+ |

ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, HER: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

2.2.1 CÁNCER DE MAMA DE SUBTIPO BASAL

De los 4 subtipos principales de cáncer de mama el subtipo basal (BLBC) que comprende hasta un 25% de todos los cánceres de mama, ha ganado un gran interés debido a que presenta un mal pronóstico. La quimioterapia es su única modalidad de tratamiento y no es eficaz. Por lo que este subtipo basal carece de opciones de terapia dirigida ya que subexpresa receptores de estrógeno (ER), de progesterona (PR), y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y comprenden de 60-90% de los cánceres de mama triple negativo ER-/ PR-/ HER2-, que carece de estos tres receptores (Ray PS, et al., 2011; Wang J et al., 2012).

Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de opciones terapéuticas eficaces para BLBC ha sido la incapacidad para identificar con precisión este subtipo molecular utilizando técnicas histopatológicas estándar. La mayoría de los ensayos clínicos han utilizado el fenotipo triple negativo para definir al BLBC, sin embargo, BLBC no es sinónimo del fenotipo triple negativo. El subtipo basal generalmente se identifica por la presencia del fenotipo triple negativo, de CK basales (CK5 / 6, CK 14, CK17) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Cheang MC et al., 2008; Rakha EA et al., 2009; Jensen TW et al., 2015).

Los BLBCs presentan un alto grado histológico, son tumores agresivos, que muestran una alta incidencia de mutaciones en BRCA1, y tienen una alta tasa de recurrencia o metástasis hacia el cerebro y pulmones dentro de 3-5 años desde su presentación inicial, además tienen una pobre supervivencia global (Yuan N et al., 2014; Jensen TW et al., 2015; Zuo HD y Yao WW, 2016). Este subtipo afecta preferentemente a mujeres más jóvenes, especialmente a las mujeres de ascendencia afroamericana y latina. Además, este subtipo presenta una alta tasa de crecimiento y un marcado fenotipo de transición epitelio-mesenquimal en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Sarrío D et al., 2008; Ray PS et al., 2010). Además, como dato importante se propone que al presentar cáncer de mama con receptores de estrógeno positivo (ER +) recurrente, aproximadamente el 30% se transformará a fenotipo más agresivo de tipo basal (Rakha EA et al., 2008).

Con lo anterior, el entendimiento de BLBC sigue siendo un importante reto clínico debido al desconocimiento de la base molecular para esta enfermedad, lo que dificulta los esfuerzos para desarrollar terapias específicas y de buen pronóstico.

2.3 ANTECEDENTE DEL GRUPO DE TRABAJO

En el 2015 Santuario-Facio y colaboradores identificaron el perfil de expresión de cáncer de mama triple negativo (CMTN) comparado con cáncer de mama no triple negativo (CMNTN) en una población de 32 mujeres del noroeste de México. Se identificó una firma de 40 genes asociados a este fenotipo de cáncer, dentro de los cuales se encontraron 9 genes sobreexpresados que se encuentran vinculados a la regulación del metabolismo de insulina y de esfingolípidos (Figura 1). De los 9 genes candidatos, el gen que codifica para el factor de transcripción FOXC1 fue el más eficientemente regulado a la alta en la población de mujeres con CMTN (Santuario-Facio S., et al., 2017). Con ello, es prioritario determinar su papel en la activación transcripcional de genes blanco y si estos se combinan para generar el fenotipo agresivo característico del CMTN.

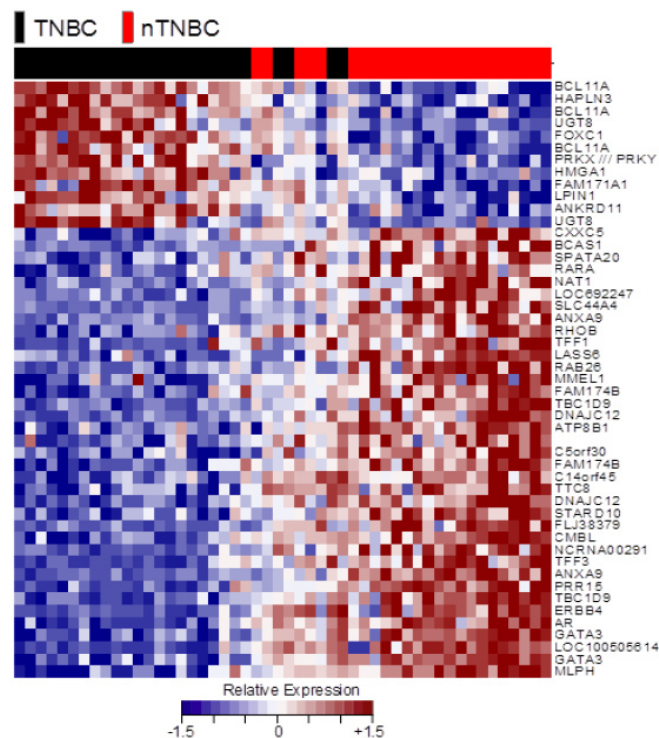


Figura 1. Firma de 40 genes asociados con el fenotipo de cáncer de mama triple negativo. 9 genes se encontraron sobreexpresados: FOXC1, BCL11A, HMGA1, PRKX, LPIN1, FAM171A1, UGT8, HAPLN3 y ANKRD11. FOXC1 fue el de mayor expresión y se ha asociado a metástasis y mal pronóstico en cáncer de mama.

2.4 GEN FOXC1 (Forkhead box C1)

El gen FOXC1 se localiza en el cromosoma 6, y presenta 1 solo exón que codifica para una proteína de 553 aminoácidos que se une a un elemento conservado de 9 pb (5'- GTAAACAAA-3') en la región promotora de sus genes blanco (GeneCards), por lo que su función principal es un factor de transcripción (Figura 2).

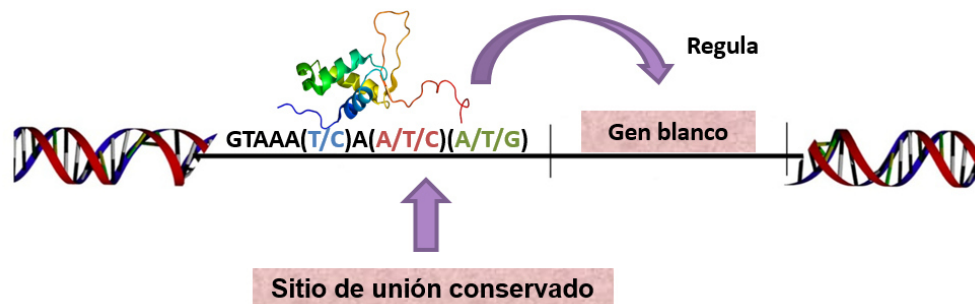


Figura 2. Elemento conservado en los promotores de genes blanco de FOXC1.

La proteína FOXC1 presenta un dominio de 110 aminoácidos que se une a una secuencia conservada de 9 pb (5'- GTAAACAAA-3') en la región promotora de sus genes blanco para regular su expresión.

Como proteína, FOXC1 pertenece a la familia de factores de transcripción Forkhead box que se caracterizan porque presentan un dominio común (dominio Forkhead) de 110-aminoácidos que se une al DNA (Wang J et al., 2012) (Fig. 2). Se conoce muy bien que las proteínas FOX regulan una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación, proliferación, apoptosis, migración, invasión, y la tumorigénesis (Wang J et al., 2012). En particular, FOXC1 en el humano está implicado en el desarrollo del cerebro, corazón, y el ojo durante la etapa embrionaria (Lam EW, et al., 2013). Su importancia como un factor de transcripción durante la etapa embrionaria demuestra que ratones knockout para FOXC1 muestran defectos cardiovasculares y mueren ya sea en el período perinatal o poco después del nacimiento (Rakha EA et al., 2008). Por su parte, en los seres humanos, se ha observado que mutaciones o desregulación en FOXC1 se asocian con el síndrome de Axenfeld Rieger (que causa anomalías en la parte frontal del ojo,

como iris delgada) y el síndrome de Dandy-Walker (malformación que afecta el desarrollo estructural del cerebro) (Ray PS et al., 2010).

2.5 PAPEL DEL GEN FOXC1 EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA

Existe evidencia científica de la correlación de la expresión de FOXC1 en diversos tipos de cáncer. Se ha demostrado la sobreexpresión de FOXC1 en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, adenocarcinoma de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma gástrico (Sarrío D et al., 2008; Ray PS et al., 2010; Hajjari M et al., 2013; Wang J et al., 2012). La expresión de FOXC1 es significativamente mayor en el subtipo basal que en otros subtipos, correlacionando con un mal pronóstico y metástasis evidente. Además, está implicado en la promoción de la transición epitelio mesenquimal (Lam EW et al., 2013). Por otro lado, también se ha reportado incremento en la expresión de FOXC1 en lesiones metastásicas a diferencia de los tumores primarios, además el nivel de expresión es proporcionalmente correlativo con un peor pronóstico, demostrándose mayor expresión de FOXC1 en pacientes con cáncer (Ray PS. 2010; 2011; Wang J et al., 2012; Jensen TW et al., 2015). Se ha reportado que el mRNA de FOXC1 se expresa exclusivamente en BLBC y se correlaciona con un fenotipo agresivo. En particular, para el CMTN, FOXC1 presenta una expresión elevada que es consistente con el hecho de que entre el 60% y el 90% de los cánceres de mama de tipo basal son triple negativo. Por otra parte, se reportó una alta expresión de la proteína FOXC1 en muestras de tumores triple negativo que expresan citoqueratinas basales, pero no en los tumores no triple negativo (Ray PS. 2010). Asimismo, con base a datos de microarreglos de pacientes con cáncer de mama subtipo basal se ha demostrado que los pacientes con niveles elevados de mRNA de FOXC1 correlacionan con reducción significativa de la tasa de supervivencia global. Lo anterior independientemente de variables clínico-patológicas tales como la edad, el tamaño del tumor y el

estado de los ganglios linfáticos (Ray PS. 2010; Zuo HD y Yao WW 2016). Además, la expresión elevada de FOXC1, se ha asociado positivamente con metástasis y con decremento en la supervivencia libre de metástasis en cerebro (Ray PS et al., 2010; Ray PS et al., 2011).

Por otro lado, también se ha reportado que la sobreexpresión de FOXC1 en células de cáncer de mama sobre todo en las de tipo basal puede inducir en ellas: fenotipos agresivos, aumento de la proliferación celular y aumentada capacidad de migración e invasión *in vitro*, sin embargo, usando shRNA de FOXC1 en células de cáncer de mama se producen resultados opuestos, se reduce la proliferación celular y la migración (Ray PS et al., 2010; Jin Y et al., 2014). Experimentos *in vivo* han demostrado que la expresión elevada de FOXC1 promueve metástasis a pulmón y el crecimiento del tumor, lo cual se correlaciona con alta expresión de Ki-67 (Ray PS et al., 2011). Se ha indicado que FOXC1 es crítico para la progresión tumoral en la línea celular humana MDA-MB- 231 de subtipo basal (BLBC) (Zuo HD y Yao WW, 2016; Ray PS et al., 2011). Finalmente, los resultados correlativos entre la expresión de FOXC1, desarrollo de tumores y la sobrevida de los sujetos se enaltece por Ray et al., 2011 quienes proponen al mRNA de FOXC1 y los niveles de proteína de FOXC1 como un biomarcador específico para BLBC, ofreciendo no sólo un potencial candidato pronóstico sino también una diana terapéutica para este subtipo de cáncer de mama.

2.6 IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE FOXC1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares asociados al efecto del FOXC1 en la expresión diferencial de genes y su correlación el desarrollo del cáncer, nuestro grupo de investigación ha empleado líneas celulares como modelo de estudio. Empleando PCR en tiempo real se evaluó la expresión relativa de FOXC1 en 7 líneas celulares que representan a los diferentes subtipos de cáncer de mama (Figura 3). Como resultado se encontró

que FOXC1 exhibe diferencias en la expresión selectiva en las líneas celulares: luminales, primaria y metastásica. Específicamente se obtuvo que FOXC1 está subexpresado en la línea primaria a diferencia de la metastásica. También se encontró que la línea HER2 expresa FOXC1 y que hay diferencias en las líneas primarias y metastásica que son triple negativo, resultó que no todos los subtipos triples negativo sobreexpresan FOXC1, el metastásico sí, y fue la línea que tuvo mayor expresión de FOXC1.

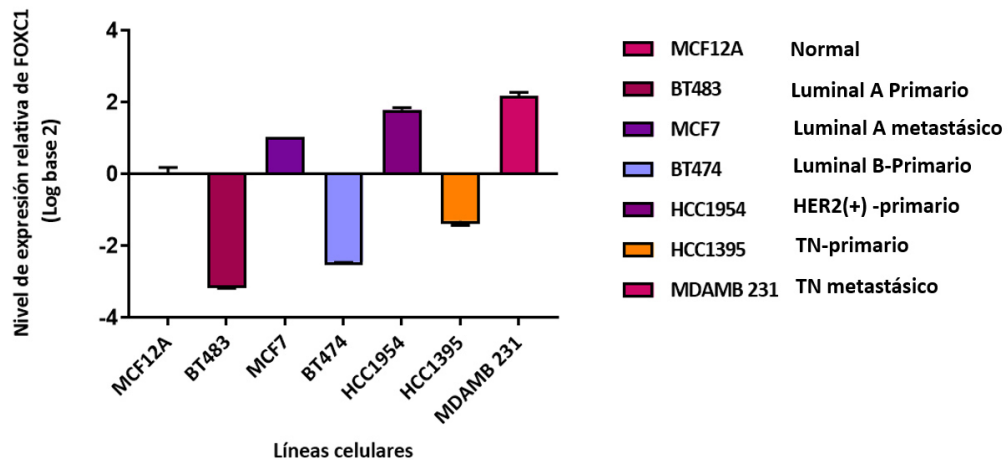


Figura 3. Expresión de FOXC1 en líneas celulares de cáncer de mama.

En las líneas luminales primarias FOXC1 se encuentra subexpresado a diferencia de la línea luminal metastásica. La línea HER2(+) presentó sobreexpresión de FOXC1. En las líneas triple negativo, la línea primaria subexpresa FOXC1 y la línea metastásica presentó mayor sobreexpresión de FOXC1 de todos los subtipos. $P < 0.05$ vs las células normales MCF12A. Promedio de tres experimentos independientes.

2.7 BLANCOS MOLECULARES DE FOXC1 EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA

Como hemos comentado, FOXC1 se sobreexpresa en algunos cánceres de naturaleza agresiva y metastásicos. Sin embargo, aún no están claros los blancos moleculares de FOXC1 durante el desarrollo del cáncer de mama. La expresión de FOXC1 sólo se ha reportado en tejido sano de ojo (Tamimi Y et al., 2004) y en cáncer gástrico (Xu G et al., 2016). De cualquier manera, la expresión

de FOXC1 en ambos tejidos no comparte genes en común, por lo que se piensa que la expresión de FOXC1 es tejido específico.

Ray y cols. identificaron un conjunto de 30-genes asociados a la expresión de FOXC1 (Ray PS et al., 2010). El análisis de esta firma no dio una vía dominante, sin embargo, destacan algunos miembros como FABP7, GABRP, EN1, KCNK5, ZIC1, ACTR3B, y FOXC1 que están implicadas en particular en el desarrollo del cerebro y la tumorigénesis del sistema nervioso (Ray PS et al., 2010). Sin embargo, los genes no se relacionan con las dianas moleculares reportadas por Wang J et al., 2012 y Steven TS et al., 2012.

Información adicional ha demostrado que, si bien no existe un claro efector que promueva la interacción de genes con FOXC1, la activación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) a nivel de membrana plasmática fomenta mientras que su inhibición *in vivo* reprime la transcripción de FOXC1 a través de las vías ERK y Akt en los tumores de xenoinjertos (Jin Y et al., 2014). Por otra parte, se ha demostrado que los genes BRCA1 y GATA3 interactúan sobre el promotor FOXC1 y que se requiere BRCA1 GATA3 para el reclutamiento de esta región (Tkocz D et al., 2012).

Quizá el aporte más importante de la selectividad de FOXC1 para regular sus dianas moleculares sea la propuesta por Wang J et al., 2012, quienes demostraron que FOXC1 activa el factor de transcripción NF-kB (Wang J et al., 2012) y que induce la expresión de la metaloproteasa de matriz 7 (MMP7) (Steven TS et al., 2012).

Ante este escenario desconocemos los candidatos potenciales que regulan la expresión de FOXC1 en cáncer de mama y los blancos predilectos que son regulados por este factor de transcripción.

CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama afecta a más de 1,7 millones de mujeres en todo el mundo cada año y representa alrededor del 14% de las muertes relacionadas con el cáncer en las mujeres.

El factor de transcripción FOXC1 está implicado en el desarrollo embrionario normal y regula el desarrollo y la función de muchos órganos. Sin embargo, recientemente, un gran conjunto de literatura ha demostrado que FOXC1 juega un papel crítico en el desarrollo de tumores y metástasis.

Los estudios clínicos y el análisis de expresión génica en cáncer de mama han demostrado que, en comparación con otros subtipos moleculares, FOXC1 se expresa altamente y específicamente en el cáncer de mama de subtipo basal que comprende de 60-90% de los cánceres de mama triple negativo.

La expresión de FOXC1 en cáncer de mama de subtipo basal y triple negativo se ha relacionado con un pobre pronóstico, con una mayor progresión e invasión del tumor, así como una menor supervivencia del paciente. Aunque las funciones exactas de FOXC1 en la progresión del cáncer todavía necesitan ser dilucidadas.

Con ello se necesitan más estudios que caractericen molecularmente si FOXC1 tiene un papel importante en la regulación y activación de genes que inducen un fenotipo más agresivo en el cáncer de mama subtipo basal y triple negativo.

En este trabajo se propone identificar mediante el silenciamiento y sobreexpresión de FOXC1 cuáles son sus posibles genes blancos en líneas celulares de cáncer de mama.

CAPÍTULO 4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los genes blanco regulados por FOXC1 en líneas celulares de cáncer de mama?

CAPÍTULO 5 HIPÓTESIS

El silenciamiento o sobreexpresión de FOXC1 permitirá identificar sus posibles genes blanco y su participación en cáncer de mama.

CAPÍTULO 6 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar el silenciamiento o sobreexpresión del factor de transcripción FOXC1 para determinar sus posibles genes blanco y su participación en cáncer de mama.

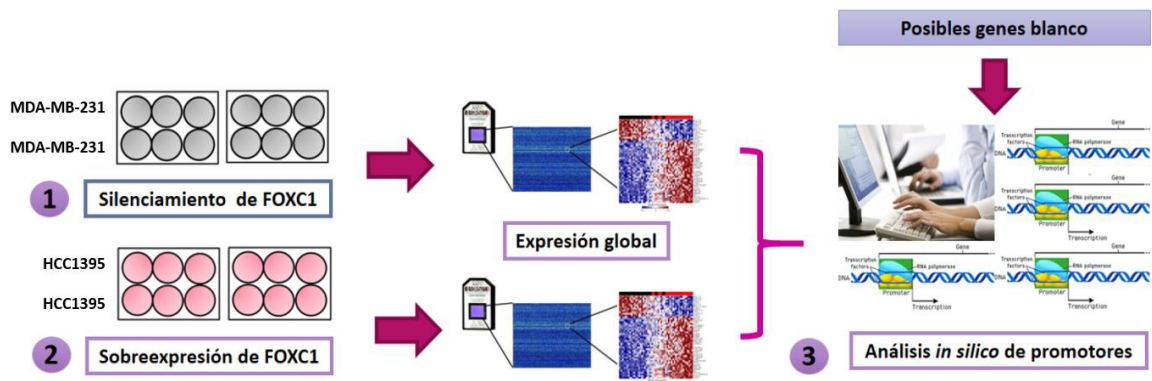
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mamá triple negativo metastásico y analizar el efecto en la expresión global.
2. Realizar la sobreexpresión transitoria de FOXC1 en la línea celular HCC1395 de cáncer de mama triple negativo primario y analizar el efecto en la expresión global.
3. Analizar *in silico* sitios de unión a FOXC1 en los promotores de los genes determinados experimentalmente.

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 - Estrategia general



7.2 Cultivo celular

En este trabajo se utilizaron 2 líneas de células de cáncer de mama triple negativo: La línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) de adenocarcinoma metastásico y la línea celular HCC1395 (ATCC® CRL-2324™) de carcinoma ductal primario, ambas líneas fueron cultivadas y mantenidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Caisson Labs) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco Life Technologies) y 1% de antibiótico-antimicótico en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37° C. Las células se mantuvieron mediante sub-cultivos semanales en cajas de 25 cm². Cuando fue necesario las células se disgregaron mediante su incubación con 2-3 mL Tripsina-EDTA (Gibco Life Technologies), una vez disgregadas la tripsina fue inactivada con 2-3 mL de medio DMEM (10% SFB), la suspensión de células obtenida fue pasada a un tubo de 15 mL y centrifugada a 2,500 rpm durante 5 min (Centrifuga Sorvall ST 40, Thermo Scientific), se retiró el medio y el pellet celular fue resuspendido en 2

mL de medio. Las células se pasaron a una nueva caja o fueron contadas en una cámara de Neubauer para ser plaqueadas.

7.3 Silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 y análisis de su efecto en la expresión global.

7.3.1. Selección de la densidad celular

Debido a que el número exacto de células requeridas para la siembra y transfección depende del tipo de célula, el tamaño y velocidad de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento de la línea MDA-MB-231. Se cultivaron en una placa de 96 pozos, 5,000, 10,000, 15, 000, 20,000 y 30,000 células por pozo y se monitoreó el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas. De manera general, la confluencia óptima para la transfección es 30-80%.

7.3.2 Selección del agente transfectante.

Para el silenciamiento de FOXC1 se empleó un siRNA de FOXC1 (FOXC1 Silencer® Select Pre-designed siRNA, Cat# 4392420 ID: s5226, Ambion) y el kit Silencer® siRNA Transfection II (Cat# AM1631, Ambion) el cual incluye dos agentes de transfección, siPORT NeoFX™ y siPORT Amine y controles para la optimización de la transfección de siRNA. El control de siRNA positivo, tiene como blanco el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y el control de siRNA negativo es una secuencia scrambled que no tiene ninguna homología con el genoma humano, ratón o rata.

La selección del mejor agente de transfección para la línea MDA-MB-231 se identificó siguiendo las condiciones sugeridas por el kit empleando una placa de 96 pozos (ANEXO 1) y cada tratamiento se realizó por triplicado. Se realizó una placa individual para evaluar la transfección a las 24, 48 y 72 horas y se hizo la extracción y purificación del RNA (ANEXOS 2 y 3).

7.3.3 RT-qPCR para determinar el silenciamiento de FOXC1 a nivel transcripcional.

- **Cuantificación del RNA**

El RNA se cuantificó en nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y mediante el kit “QuantiT™ RiboGreen® RNA Assay Kit” (Invitrogen™, R11490) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA se almacenó a -80°C o a -20°C si se trabajó inmediatamente.

- **Reacción de Transcriptasa Reversa**

Para la síntesis de cDNA (Tabla 2) se utilizaron 100 ng del RNA total. Se usó el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” de Applied Biosystems para la reacción de transcriptasa reversa. Y se usó Oligo (dT) 15 (Applied Biosystems). La reacción general para cada muestra fue la siguiente:

Tabla 2. Reacción para la síntesis de cDNA.

| | |
|----------------------------|------------------------------------|
| 2 µL | RT buffer 10 X |
| 0.8 µL | dNTP Mix 25X [100 mM] |
| 1 µL | Oligo(dT)15 |
| 1 µL | MultiScribe™ Reverse Transcriptasa |
| 1 µL | RNasa inhibidor |
| x µL | RNA |
| x µL | Agua libre de nucleasas |
| 20 µL Volumen final | |

La reacción fue incubada en un termociclador con el siguiente programa: 25°C 10 min, 37°C 120 min y 85°C 5 min.

- **PCR en tiempo real**

Se amplificó 1 µL de cDNA (a partir de 100 ng de RNA) de cada muestra utilizando como gen endógeno GAPDH y sondas TaqMan (Tabla 3). Cada reacción se realizó por triplicado, y fue colocada en una placa de 96 pozos la cual se incubó en el termociclador LightCycler® 480 de Roche durante 1:45 h.

Tabla 3. Sondas TaqMan.

| Gen | Compañía | Concentración | Volumen de trabajo* |
|-------|-------------------|---------------|---------------------|
| UGT8 | Applied Biosystem | 20X | 0.5 µL |
| GAPDH | | | |

* Para un volumen final de 10 µL de reacción.

Se utilizó TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X) de Applied Biosystems para iniciar la reacción de expresión en tiempo real. La reacción general de amplificación para cada muestra fue la siguiente (Tabla 4):

Tabla 4. Reacción general de PCR para 1 reacción.

| | |
|----------------------------|-----------------------------------------|
| 2 µL | TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X) |
| 0.5 µL | Sonda TaqMan Gene Expression* |
| 1 µL | cDNA |
| 3.5 µL | Agua libre de nucleasas |
| 10 µL Volumen final | |

Nota: Los volúmenes se ajustaron de acuerdo al número de reacciones por ensayo y calculando un 10% extra para compensar la pérdida de volumen durante la transferencia de reactivos.

El programa de amplificación fue como lo indica la tabla 5:

Tabla 5. Programa general de amplificación.

| Etapa | Temperatura y duración |
|--------------------------|------------------------|
| Activación de la enzima | 95° 10 min* |
| Desnaturalización | 95°C 15 seg |
| Alineamiento y extensión | 60°C 1 min |
| Ciclos | 50 |

*1 ciclo

- **Análisis de la expresión génica**

Se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ para determinar la expresión génica relativa de los datos de qPCR y se utilizó a las células sin tratamiento como muestra calibradora.

7.3.4 Ensayo de silenciamiento de FOXC1

Una vez estandarizado el protocolo de silenciamiento, se procedió a silenciar a FOXC1 en placas de 6 pozos (ANEXO 1), se incluyeron los controles: positivo (siRNA GAPDH), negativo (siRNA scrambled) y un control de células solas sin manipular. Se realizó la extracción y purificación de RNA (ANEXOS 2 y 3) de las células para comprobar el silenciamiento de FOXC1 a nivel transcripcional mediante qPCR de acuerdo al punto 7.3.3. Una vez comprobado el silenciamiento se realizó un análisis de integridad del RNA usando Agilent 2100 Bioanalyzer y el kit RNA 6000 Nano (Agilent) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se procedió a realizar microarreglos de expresión (Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix) (ANEXO 7).

7.4 Sobreexpresión transitoria de FOXC1 en la línea HCC1395 y análisis de su efecto en la expresión global.

7.4.1 Sobreexpresión transitoria de FOXC1

Para realizar la sobreexpresión transitoria se utilizó un vector comercial de ORIGENE (cat. RG215629), el plásmido pCMV6-AC-GFP que contiene la secuencia clonada de FOXC1 (NM_001453.2) que incluye un ORF de 1659 pb, contiene un promotor de citomegalovirus para una expresión óptima. El plásmido fue amplificado mediante la transformación de células competentes *E. coli* DH5 α (ANEXO 4), una vez que se comprobó que contenían el plásmido, se seleccionaron colonias aisladas y se procedió a la purificación del plásmido utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) (ANEXO 5). La calidad del plásmido se verificó utilizando NanoDrop 8000.

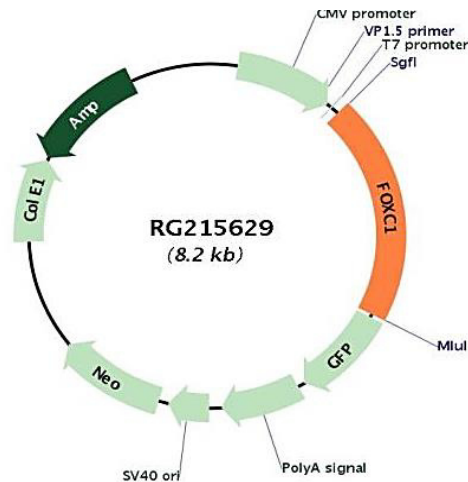


Figura 4. Vector de expresión pCMV6-AC-GFP. El vector tiene un tamaño de 8.2 kb y contiene clonada la secuencia de FOXC1 (NM_001453.2) un ORF de 1659 pb, un promotor de CMV, como gen reportero GFP y resistencia a ampicilina en bacterias y a neomicina en células de mamífero.

Para inducir la sobreexpresión se utilizó el kit Xfect™ Single Shots (Midi) Protocol-At-A-Glance (Clontech), Xfect es un reactivo de transfección que contiene un polímero catiónico biodegradable que se une al DNA, lo que resulta en la formación de nanocomplejos que se internalizan rápida y eficientemente por la célula. El reactivo de transfección Xfect es compatible con suero, por lo que las células no se estresan y producen muerte apoptótica.

Para identificar el tiempo de mayor sobreexpresión de FOXC1 en la línea HCC1395, se emplearon placas de 6 pozos y se cultivaron 110,000 células por pozo, antes de la transfección se les removió el medio y se reemplazó con medio fresco. Se siguieron las instrucciones del fabricante (ANEXO 6) y los tratamientos fueron los siguientes: células transfectadas con el vector, células transfectadas con el reactivo de transfección Xfect excepto el vector, como control negativo, y células sin estimulación. Cada tratamiento se realizó por duplicado durante 24, 48 y 72 horas. Se determinó la sobreexpresión mediante RT-qPCR siguiendo el protocolo descrito en el punto 7.3.3 y se seleccionó el tiempo en el que se evidenció mayor sobreexpresión. Posterior a la identificación del tiempo de mayor sobreexpresión se repitió el ensayo a las 48 horas por duplicado en dos ensayos

independientes. Se realizó la extracción y purificación de RNA (ANEXOS 2 y 3) y se comprobó la sobreexpresión de FOXC1 a nivel transcripcional mediante qPCR de acuerdo al punto 7.3.3. Una vez comprobado el silenciamiento se realizó un análisis de integridad del RNA usando Agilent 2100 Bioanalyzer y el kit RNA 6000 Nano (Agilent) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se procedió a realizar microarreglos de expresión (Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix) (ANEXO 7).

7. 5 Análisis de expresión global mediante microarreglos

Se utilizó el protocolo de Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit (ANEXO7) como se describe a continuación: se realizó la preparación de controles poly A y se agregó a las muestras de RNA total, posteriormente, se sintetizó la primera y segunda cadena de cDNA, para a partir del cDNA realizar la transcripción *in vitro* (IVT) y generar aRNA (RNA amplificado) marcado. El aRNA marcada fue purificada usando perlas magnéticas, las cuales se unieron en primera instancia al aRNA y usando un magneto fueron retenidas mientras fueron lavadas con etanol y soluciones de lavado, y finalmente, se eluyeron en una solución de elución donde se obtuvo el aRNA marcado purificado. El aRNA marcado y purificado fue evaluado por NanoDrop 8000 para saber si se obtuvo suficiente cantidad para proseguir con la fragmentación (mínimo 15 µg). La fragmentación fue realizada usando un buffer de fragmentación y fue analizada mediante un chip de Experion™ Automated Electrophoresis Station (RNA standard). Posteriormente, la hibridación fue realizada colocando la muestra en una mezcla de hibridación dentro de un chip Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix, y dejando hibridar en el horno de hibridación por 16 horas a 45°C a una velocidad de rotación de 60 rpm. Cuando la hibridación terminó, la muestra y la mezcla de hibridación fueron retiradas del chip, este fue rellenado con solución Holding buffer y fue lavado en la estación de fluidos 450 de la plataforma de Affymetrix. En este proceso se incluyeron lavados con buffers de lavado incluidos en el kit, así como con soluciones de tinción para poder detectar la señal en el escáner. Al finalizar la estación de fluidos, el chip fue llenado con holding

buffer y evitando que se generen burbujas, se colocó en el escáner de Affymetrix donde fue escaneado y se generaron tanto la imagen como los archivos necesarios para su posterior análisis. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Expression Console de Affymetrix, para el tratamiento estándar de los datos (normalización global), y para determinar genes diferencialmente expresados se utilizó el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix. A partir de los genes que resultaron, se realizó un análisis en Panther para determinar funciones moleculares, procesos biológicos y vías de señalización.

7.6 Análisis *in silico* de los promotores génicos identificados en los ensayos de silenciamiento y sobreexpresión.

A partir de los genes diferencialmente expresados (por ejemplo, CXCL3, CCL20, KDR, ADAM10, MDM2 y FNDC3B) durante el protocolo de silenciamiento y sobreexpresión de FOXC1, se buscó si presentaban sitios de unión a FOXC1. Inicialmente, se buscó la secuencia a la cual se une este factor de transcripción la cual ya había sido reportada previamente por Pierrou, S *et al.* 1994 como un core de 9 pb (GTAAA(T/C)A(A/T/C)(A/T/G) donde algunas bases pueden cambiar lo que resulta hasta en 18 posibles combinaciones de sitios de unión. De cada gen se buscó su secuencia promotora, 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción en Ensemble y en Genome Browser y se descargó en formato FASTA. La búsqueda en los promotores de sitios de unión a FOXC1 se realizó en tres programas o software: MatInspector (Genomatix), PATCH (Pattern Search For Transcription Factor Binding Sites) y JASPAR (2016). Finalmente, ya que se determinaron posibles genes blanco de FOXC1, se realizó un análisis de interacciones de todos los genes diferencialmente expresados (por ejemplo, CXCL3, CCL20, KDR, ADAM10, MDM2, FNDC3B y HIBCH) tanto del silenciamiento como de la sobreexpresión de FOXC1 y se señalaron nuevas interacciones predichas *in silico*.

CAPÍTULO 8 RESULTADOS

8.1 Silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 y análisis de su efecto en la expresión global.

Se estandarizó el silenciamiento durante 24, 48 y 72 horas y se estableció como confluencia óptima para la transfección 15,000 células por pozo para una placa de 96 pozos. Se probaron ambos agentes de transfección siPORT NeoFX™ y siPORT Amine y se comprobó que el agente más eficiente para la línea MDA-MB-231 fue el agente siPORT Amine. Se determinó usar 40 nM como concentración final de siRNA y se estableció usar medio OPTI-MEM I (1X) durante todo el tiempo de transfección. Todas las muestras de RNA del ensayo tuvieron un buen rendimiento y una buena calidad (Tabla 6) de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 (1.7 – 2.1).

Tabla 6. Rendimientos de RNA de la estandarización del silenciamiento de FOXC1.

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

Los resultados muestran el silenciamiento de FOXC1, a las 24 horas exhibe un 29% de silenciamiento, a las 48 horas un 55% y a las 72 horas un 65%. Se eligió el tiempo de 72 horas como el óptimo para los siguientes experimentos (Figura 5).

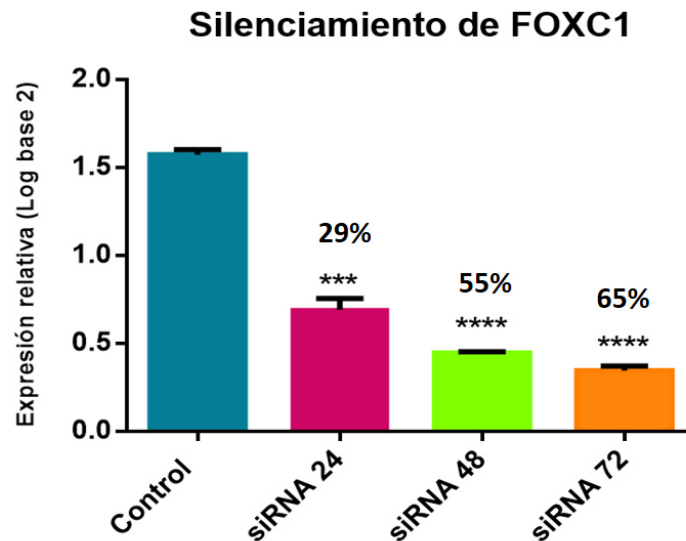


Figura 5. Estandarización del silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 triple negativo metastásico. Expresión relativa del silenciamiento de FOXC1 a las 24, 48 y 72 horas. Máximo silenciamiento a las 72 horas. $P < 0.05$ vs el control.

Con las condiciones establecidas se realizó un ensayo final por duplicado en dos experimentos independientes para obtener RNA para microarreglos. Se realizó en placa de 6 pozos por triplicado y se escaló a 250,000 células por pozo. En estas condiciones se obtuvo un silenciamiento del 60% a las 72 horas (Figura 6). Todas las muestras de RNA del ensayo presentaron un buen rendimiento y calidad (Tabla 7) de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 (1.7 – 2.1).

Tabla 7. Rendimientos de RNA del ensayo final del silenciamiento de FOXC1.

| RNA | NanoDrop | | RiboGreen® |
|-------------------|----------|-----------|------------|
| | [ng/mL] | A 260/280 | [ng/mL] |
| siRNA FOXC1 1 | 3107.73 | 2.02 | 3107.70 |
| Células control 1 | 3556.96 | 2.06 | 3557.10 |
| siRNA FOXC1 2 | 2501.34 | 1.99 | 2501.40 |
| Células control 2 | 5912.38 | 2.04 | 5912.40 |
| siRNA Scramble | 2608.02 | 2.02 | 2607.90 |
| siRNA GAPDH | 2753.74 | 2.01 | 2753.70 |

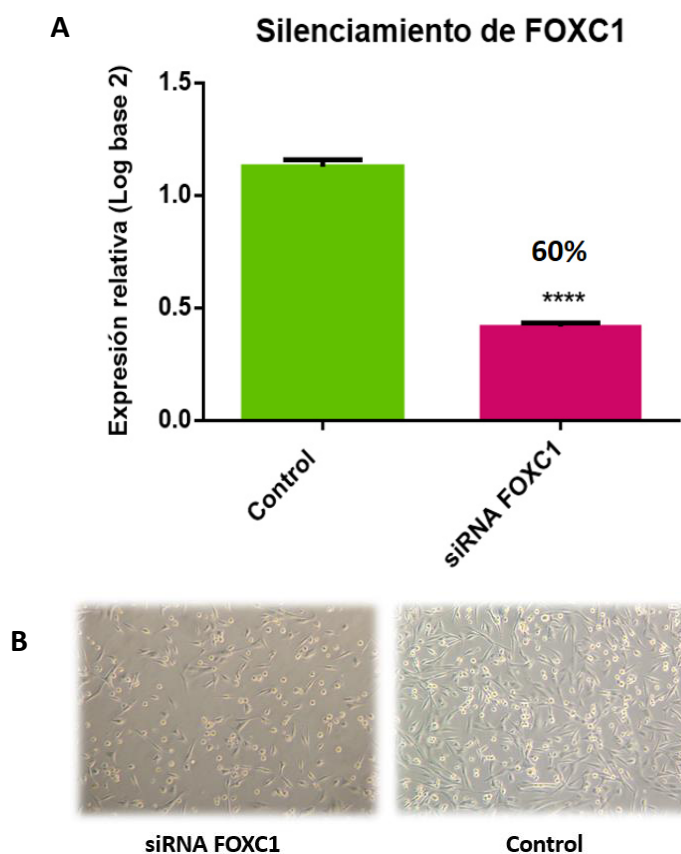


Figura 6. Silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 triple negativo metastásico. a) Expresión relativa del silenciamiento de FOXC1. Máximo silenciamiento de 60% a las 72 horas. $P < 0.05$ vs el control. Promedio de dos ensayos independientes. b) Células transfectadas con el siRNA de FOXC1 vs células control.

Una vez comprobado el silenciamiento de FOXC1, se procedió a evaluar la integridad de las muestras de RNA. Todas las muestras tuvieron un RQI (RNA quality indicator) mayor a 8 comprobándose óptimas para su procesamiento por microarreglos (Figura 7).

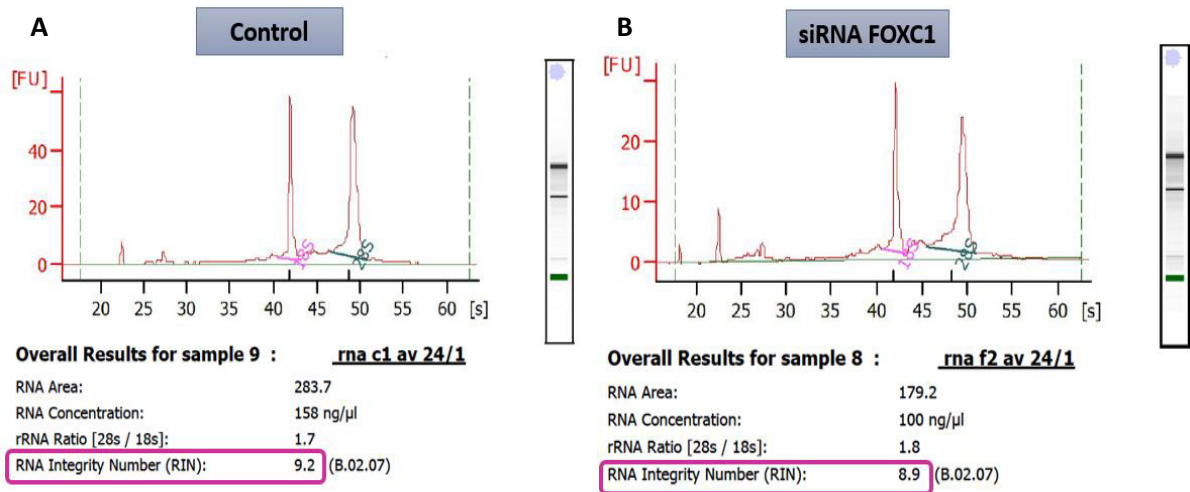


Figura 7. Evaluación de la integridad del RNA obtenido del silenciamiento de FOXC1 en la línea MDA-MB-231 triple negativo metastásico. Gráficas representativas del análisis de integridad de RNA por Bioanalyzer donde se observa la separación e integridad de los RNAs 18S y 28s. a) Muestra de RNA control. b) Muestra de RNA con silenciamiento de FOXC1. Ambas muestras tienen un RIN (Número de integridad del RNA) mayor a 8 indicando una óptima integridad para continuar con el procesamiento de las muestras por microarreglos.

8.1.3 Análisis de expresión global mediante microarreglos.

Como resultado del efecto del silenciamiento de FOXC1 en la expresión global se identificaron 39 genes diferencialmente expresados: 35 sobreexpresados (IL1B, CXCL3, KDR, CCL20, por ejemplo) que representan principalmente a citocinas, interleucinas y genes asociados a proliferación y se identificaron 4 genes subexpresados (ADAM10, NME7, PPP1CB y DOCK5) los cuales se relacionan a la escisión de moléculas y a proliferación celular (Figura 8).

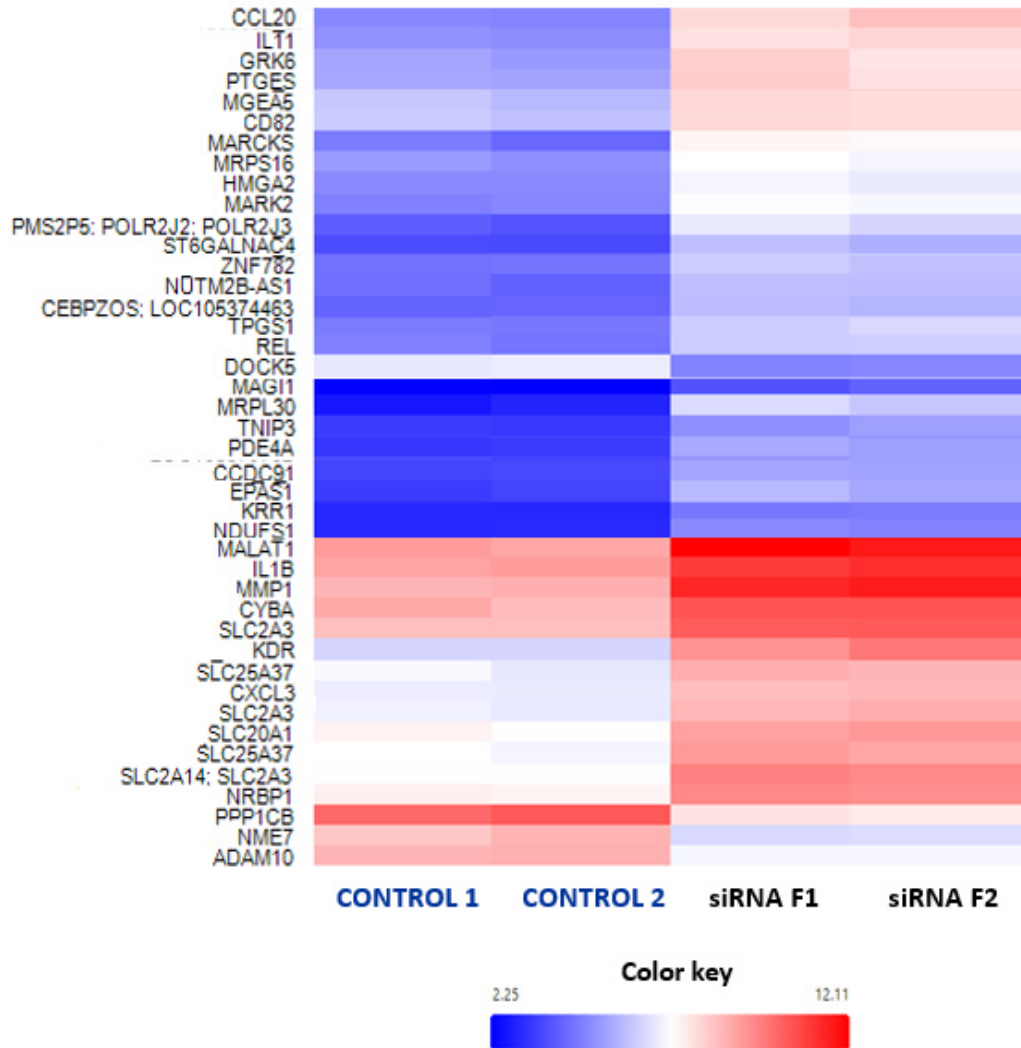


Figura 8. Genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDA-MB-231. Se identificaron 39 genes diferencialmente expresados con un Fold change ≥ 3 y $p < 0.01$ (ANOVA p-value). En el mapa de calor, cada columna es un duplicado del silenciamiento o el control y cada fila representa una sola sonda.

Tabla 8. Genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1 en la línea celular MDA-MB-231.

| Sobreexpresados | | Subexpresados | |
|------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| Gen | Fold Change | Gen | Fold Change |
| KRR1 | 3.01 | PPP1CB | -5.85 |
| REL | 3.06 | DOCK5 | -3.9 |
| ZNF782 | 3.08 | NME7 | -3.87 |
| NUTM2B-AS1 | 3.13 | ADAM10 | -3.1 |
| CEBPZOS | 3.15 | | |
| CXCL3 | 3.23 | | |
| MAGI1 | 3.31 | | |
| SLC20A1 | 3.34 | | |
| TPGS1 | 3.36 | | |
| CCDC91 | 3.52 | | |
| TNIP3 | 3.52 | | |
| CD82 | 3.53 | | |
| CYBA | 3.54 | | |
| NDUFS1 | 3.57 | | |
| SLC2A3 | 3.73 | | |
| SLC25A37 | 3.76 | | |
| NRBP1 | 3.8 | | |
| MRPS16 | 3.83 | | |
| HMGA2 | 3.84 | | |
| MGEA5 | 3.85 | | |
| IL1B | 4.13 | | |
| PDE4A | 4.2 | | |
| ST6GALNAC4 | 4.31 | | |
| EPAS1 | 4.47 | | |
| MARK2 | 4.87 | | |
| SLC2A14 | 5.1 | | |
| PTGES | 5.64 | | |
| GRK6 | 5.93 | | |
| MMP1 | 6.85 | | |
| IL11 | 7.09 | | |
| MALAT1 | 7.24 | | |
| MARCKS | 7.39 | | |
| KDR | 8.73 | | |
| CCL20 | 9.83 | | |
| MRPL30 | 11.08 | | |

A partir de los genes diferencialmente expresados se realizó una clasificación en PANTHER para identificar la participación de los genes en funciones moleculares y procesos biológicos y vías de señalización. Se demostró que los genes afectados por el silenciamiento, tienen principalmente funciones de adhesión y de actividad catalítica, mientras que la mayoría participan en procesos celulares y procesos metabólicos. De importancia la vía de señalización en donde participan más genes es la de Inflamación mediada por quimiocinas y la señalización de citocinas (Figura 9).

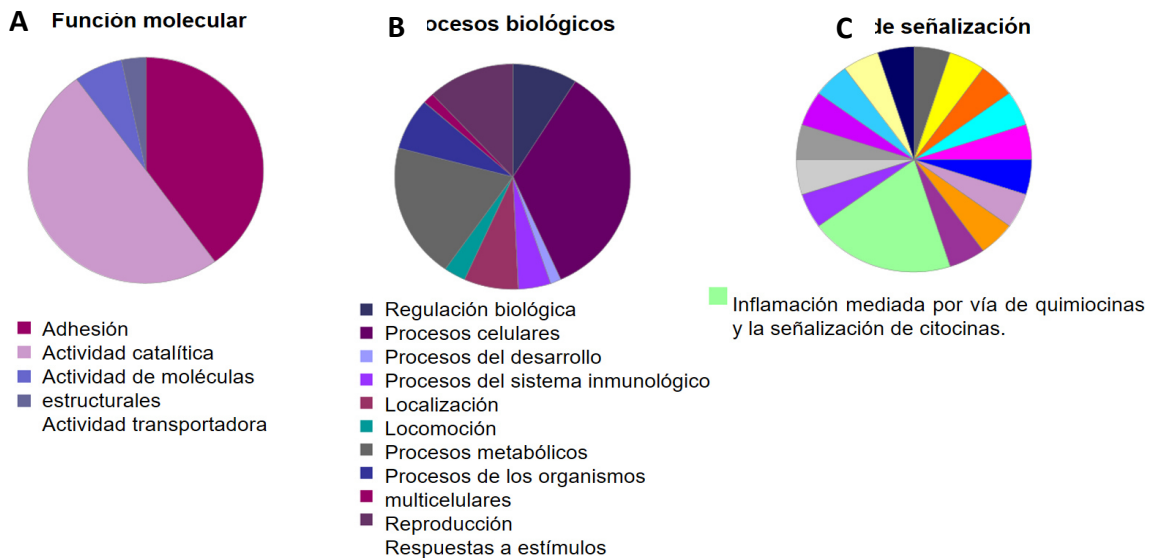


Figura 9. Clasificación en PANTHER de los genes afectados por el silenciamiento de FOXC1. a) Función molecular: principalmente adhesión y actividad catalítica, b) Procesos biológicos, la mayoría procesos celulares y procesos metabólicos, c) vías de señalización: La vía donde participan más genes fue la vía de inflamación mediada por quimiocinas y la señalización de citocinas.

8.2 Sobreexpresión transitoria de FOXC1 en la línea HCC1395 y análisis de su efecto en la expresión global.

Los ensayos de sobreexpresión se realizaron a los tiempos de 24, 48 y 72 horas. Todas las muestras de RNA del ensayo tuvieron un buen rendimiento y calidad (Tabla 8) de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 (1.7- 2.1).

Tabla 9. Rendimientos de RNA de la estandarización de la sobreexpresión de FOXC1.

| Tiempo | RNA | NanoDrop | |
|--------|---------------|----------|--------------|
| | | [ng/mL] | Abs. 260/280 |
| 24 | Vector FOXC1 | 421.70 | 2.06 |
| | Control (-) | 337.50 | 2.10 |
| 48 | Vector FOXC1 | 496.10 | 2.02 |
| | Control (-) | 553.40 | 2.02 |
| 72 | Vector FOXC1 | 70.70 | 2.05 |
| | Control (-) | 3.77 | 2.09 |
| | Células solas | 623.3 | 2.05 |

La mayor sobreexpresión de FOXC1 se observó a las 48 horas y la expresión decayó a las 72 horas. Por lo que el tiempo ideal para realizar nuestros siguientes ensayos fue a las 48 horas. (Figura 10).

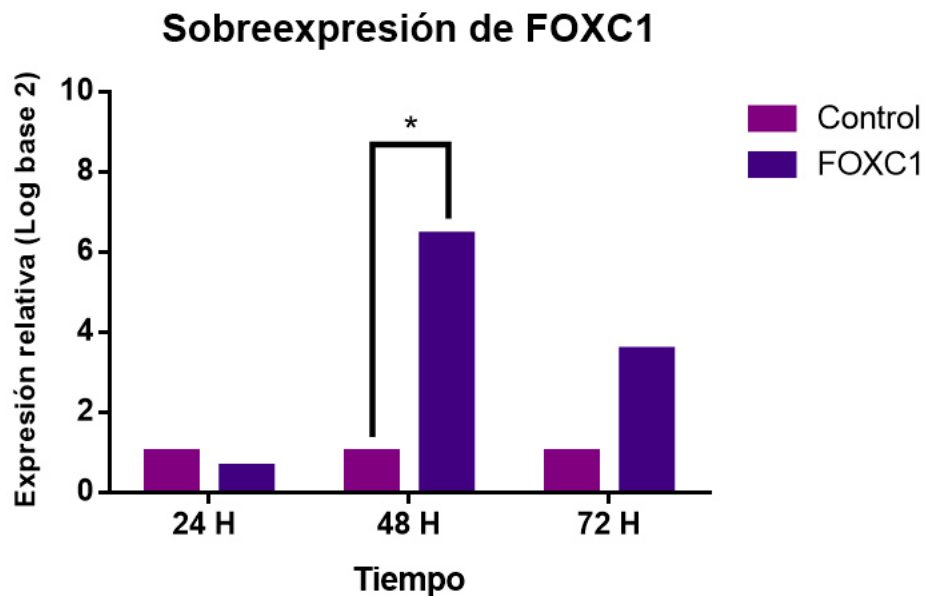


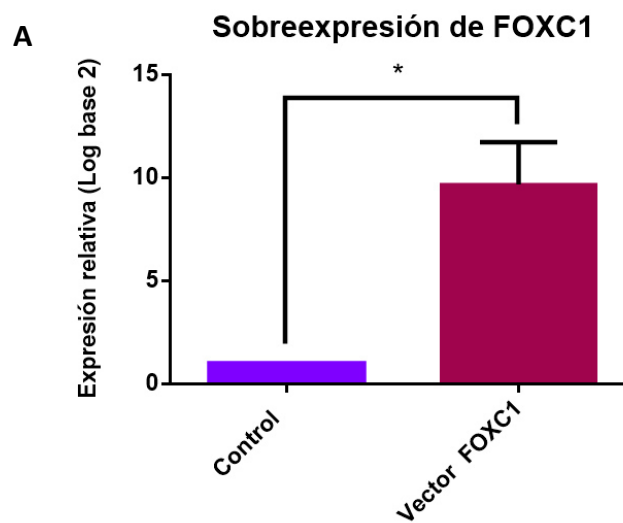
Figura 10. Estandarización de la sobreexpresión de FOXC1 en la línea HCC1395 triple negativo primaria. Expresión relativa del silenciamiento de FOXC1 a las 24, 48 y 72 horas. Máximo sobreexpresión a las 48 horas. $P < 0.05$ vs el control. Promedio de dos ensayos independientes.

Para el aislamiento y purificación de RNA en el ensayo de sobreexpresión se realizó un ensayo en placa de 6 pozos por duplicado sembrando cultivando 110, 000 células por pozo. Todas las muestras de RNA del ensayo tuvieron un rendimiento aceptable y una buena calidad (Tabla 9) de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 (1.7 – 2.1).

Tabla 10. Rendimientos de RNA del ensayo final de sobreexpresión de FOXC1.

| RNA | NanoDrop | |
|---------------|----------|-----------|
| | [ng/mL] | A 260/280 |
| Vector FOXC1 | 496.10 | 2.02 |
| Control (-) | 553.40 | 2.02 |
| Vector FOXC1 | 68.08 | 20.3 |
| Control (-) | 231.50 | 2.01 |
| Células solas | 224.60 | 2.05 |

Como resultado final se comprobó mediante qPCR la sobreexpresión de FOXC1 a las 48 horas de transfección (Figura 11).



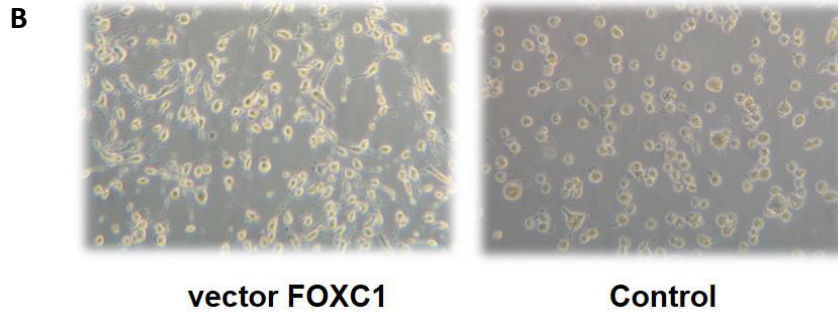


Figura 11. Ensayo de sobreexpresión final de FOXC1. a) Expresión relativa de la sobreexpresión de FOXC1. Máxima sobreexpresión a las 48 horas respecto al control. $P < 0.05$ vs el control. b) Células transfectadas con el vector de expresión de FOXC1 vs células control.

Una vez comprobado la sobreexpresión de FOXC1, se procedió a evaluar la integridad de las muestras de RNA. Todas las muestras tuvieron un RQI (RNA quality indicator) mayor 8 comprobándose óptimas para su procesamiento por microarreglos (Figura 12).

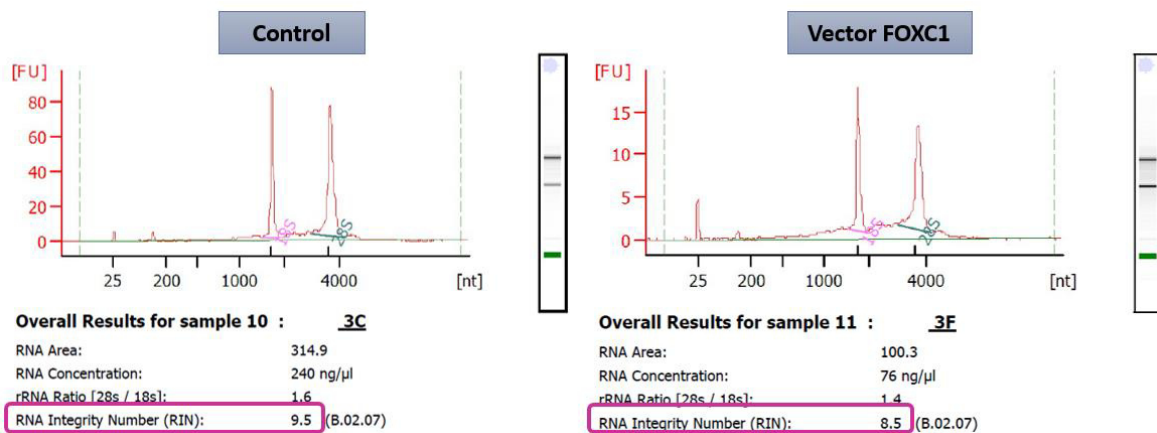


Figura 12. Evaluación de la integridad del RNA obtenido de la sobreexpresión de FOXC1 en la línea HCC1395 triple negativo primario. Gráficas representativas del análisis de integridad de RNA por Bioanalyzer donde se observa la separación e integridad de los RNAs 18S y 28s. a) Muestra de RNA control. b) Muestra de RNA con sobreexpresión de FOXC1. Ambas muestras tienen un RIN (Número de integridad del RNA) mayor a 8 indicando una óptima integridad para continuar con el procesamiento de las muestras por microarreglos.

8.2.3 Análisis de expresión global mediante microarreglos.

Como resultado del efecto del silenciamiento de FOXC1 en la expresión global se identificaron 17 genes diferencialmente expresados: 7 sobreexpresados (MDM2, LUZP1, RBM20, SERF1A, HMOX1, HIBCH y FNDC3B) principalmente relacionados a apoptosis, migración, TEM y metabolismo, y 10 genes subexpresados (VDAC2, EIF2A, DYNC1LI1, GNPTG, CFLAR, CDK5, C17orf89, MTO1, RAP1A y TPI1) los cuales fueron genes relacionados a crecimiento celular, adhesión y migración (Figura 13).

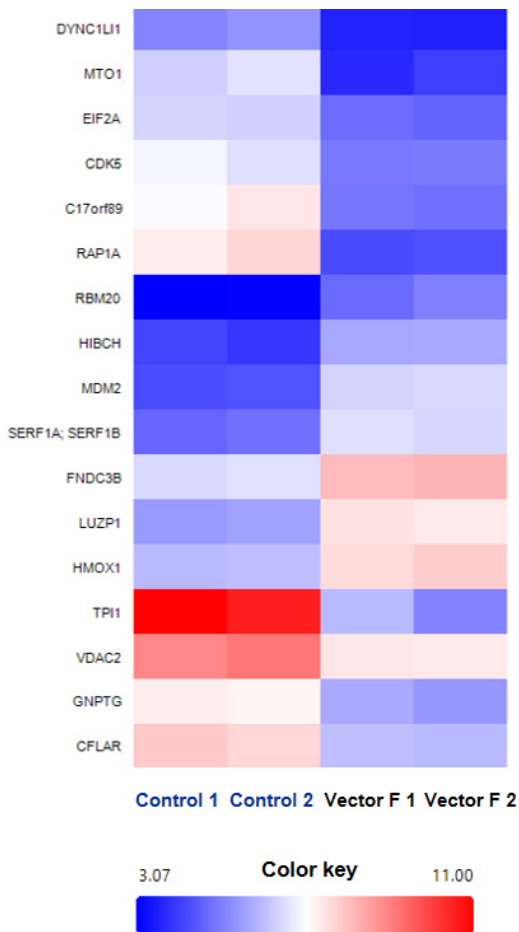
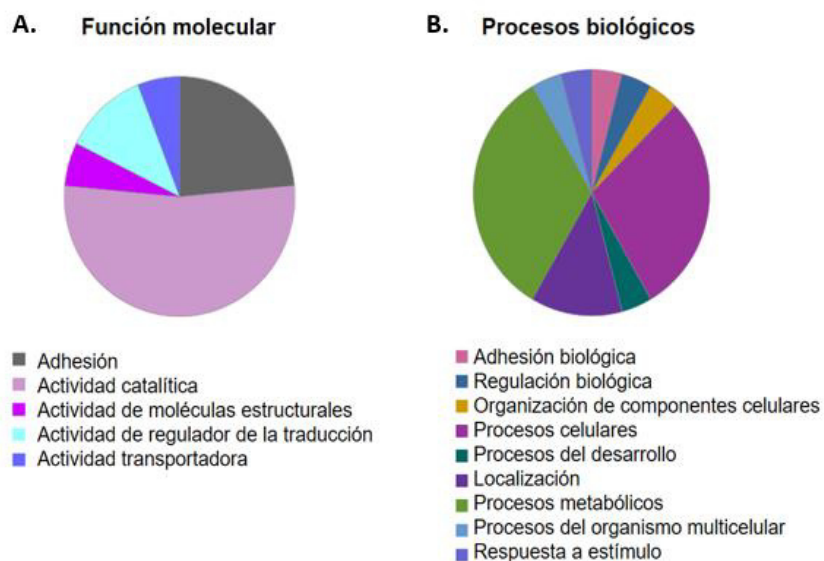


Figura 13. Genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1 en la línea celular HCC1395. Se identificaron 17 genes diferencialmente expresados con un Fold change ≥ 3 y $p < 0.01$ (ANOVA p-value). En el mapa de calor, cada columna es un duplicado de la sobreexpresión o el control y cada fila representa una sola sonda.

Tabla 11. Genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1 en la línea celular HCC1395.

| Sobreexpresados | | Subexpresados | |
|-----------------|-------------|---------------|-------------|
| Gen | Fold Change | Gen | Fold Change |
| MDM2 | 4.35 | VDAC2 | -3.09 |
| LUZP1 | 3.74 | EIF2A | -3.16 |
| RBM20 | 3.5 | DYNC1LI1 | -3.2 |
| SERF1A | 3.37 | GNPTG | -3.22 |
| HMOX1 | 3.26 | CFLAR | -3.41 |
| HIBCH | 3.22 | CDK5 | -3.42 |
| FNDC3B | 3.08 | C17orf89 | -5.09 |
| | | MTO1 | -5.98 |
| | | RAP1A | -9.3 |
| | | TPI1 | -36.98 |

A partir de los genes diferencialmente expresados se realizó una clasificación en PANTHER, como resultado se obtuvo que los genes afectados por la sobreexpresión tienen principalmente funciones de adhesión y de actividad catalítica, mientras que la mayoría participan en procesos celulares y procesos metabólicos. Y las vías de señalización en donde participan más genes fueron la vía de señalización de la apoptosis y vía de p53 (Figura 14).



C. Vías de señalización



- Vía de señalización de la apoptosis
- Orientación del axón mediada por semaforinas
- vía de señalización mediada por el receptor de dopamina
- Vía de señalización FAS
- glucólisis
- vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina
- Vía de señalización de las proteínas heterotrimeras Gi
- Vía de señalización de las proteínas heterotrimeras Gq
- Enfermedad de huntington
- Vía de insulina/IGF
- Vía de señalización de integrina
- Vía la farmacodinámica de nicotina
- Bucles de retroalimentación 1 de la vía p53
- Vía del proteosoma ubiquitina
- Bucles de retroalimentación vía 2 de la vía p53
- Vía p53

Figura 14. Clasificación en PANTHER de los genes afectados por la sobreexpresión de FOXC1. a) Función molecular: principalmente adhesión y actividad catalítica, b) Procesos biológicos, la mayoría procesos celulares y procesos metabólicos, c) vías de señalización: Las vías donde participan más genes fueron la vía de señalización de la apoptosis y vía de p53.

8.3 Análisis in silico de los promotores de los genes identificados durante los protocolos de silenciamiento y sobreexpresión

De los 39 genes diferencialmente expresados por efecto del silenciamiento de FOXC1, se identificaron 16 genes con sitios de unión a FOXC1, selectivos a la plataforma de búsqueda (Tablas 10,11 y12).

Tabla 12. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en MatInspector.

| Símbolo del gen | Cromosoma | Posición de inicio | Posición final | Cadena | Matriz. Sim | Secuencia |
|-----------------|-----------|--------------------|----------------|--------|-------------|-------------------|
| CCDC91 | chr12 | 103 | 119 | + | 0.84 | aaattGTAAattaagaa |
| KDR | chr4 | 751 | 767 | - | 0.951 | ctggtGTAAataaaaag |
| NDUFS1 | chr2 | 470 | 486 | + | 0.841 | tggaaGTAAattaataa |
| ZNF782 | chr9 | 74 | 90 | + | 0.858 | aggctGTAAagagacaa |

Tabla 13. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en PATCH.

| Símbolo del gen | Cromosoma | Position | Mismatches | Score | Binding Factor |
|-----------------|-----------|----------|------------|-------|----------------|
| CCDC91 | chr12 | 108 (+) | 1 | 90 | GTAAATAAAGA |
| KDR | chr4 | 752 (-) | 1 | 90 | GTAAATAAAGA |
| KRR1 | chr12 | 522 (+) | 1 | 90 | GTAAATAAAGA |

Tabla 14. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en JASPAR.

| Símbolo del gen | Score | Relative score | Start | End | Strand | predicted site sequence |
|-----------------|--------|-------------------|-------|-----|--------|-------------------------|
| ADAM10 | 11.092 | 0.92071894496139 | 743 | 753 | -1 | caagtaaacia |
| CCDC91 | 10.786 | 0.91612557291202 | 303 | 313 | 1 | aaagcaataa |
| | 10.566 | 0.9128231485628 | 371 | 381 | -1 | caaataaatat |
| | 10.566 | 0.9128231485628 | 910 | 920 | 1 | caaataaatat |
| CCL20 | 9.865 | 0.902300423704603 | 76 | 86 | -1 | acagtaaacia |
| | 9.850 | 0.902075258408065 | 336 | 346 | -1 | ttaatcaatat |
| CXCL3 | 12.143 | 0.9364955267388 | 415 | 425 | 1 | aacgtaaacia |
| GRK6 | 5.197 | 0.832228983422061 | 160 | 170 | -1 | ggagaaaacia |
| | 5.978 | 0.843952589861792 | 325 | 335 | 1 | aatcacaacat |
| | 5.592 | 0.838158336230888 | 932 | 942 | 1 | gaggtaaacag |
| KRR1 | 14.666 | 0.974368329616446 | 519 | 529 | 1 | aatgtaaataa |
| | 10.989 | 0.919172809925164 | 657 | 667 | 1 | catataaatat |
| MALAT1 | 12.617 | 0.943610750109392 | 597 | 607 | -1 | aaaataaacia |
| MARCKS | 11.244 | 0.923000619966305 | 104 | 114 | 1 | actgtaaataat |
| | 12.039 | 0.934934380682805 | 534 | 544 | 1 | aaagaaaacat |
| | 9.755 | 0.900649211529993 | 824 | 834 | -1 | caaataaataa |
| MRPL30 | 12.268 | 0.938371904209948 | 388 | 398 | 1 | taagaaaataa |
| NME7 | 9.739 | 0.900409035213686 | 96 | 106 | 1 | gatataaatat |
| | 10.636 | 0.913873919946643 | 808 | 818 | 1 | agggtaaacia |
| PPP1CB | 9.928 | 0.903246117950062 | 303 | 313 | 1 | tgcataaataa |
| REL | 10.026 | 0.904717197887441 | 337 | 347 | 1 | tatgcaaatac |
| TNIP3 | 10.043 | 0.904972385223518 | 470 | 480 | 1 | taagaaaacac |

Se realizó un análisis de interacciones en STRING con todos los genes que resultaron del silenciamiento. Los resultados muestran que FOXC1 parece no tener interacción con dichos genes, sin embargo, se identificó un conjunto de genes con posible interacción que incluye citocinas e interleucinas (Figura 15a). Sin embargo, después de encontrar genes con sitios de unión a FOXC1, sugerimos que este factor de transcripción puede estar regulando dichos genes y por lo tanto interaccionando con ellos (Figura 15b).

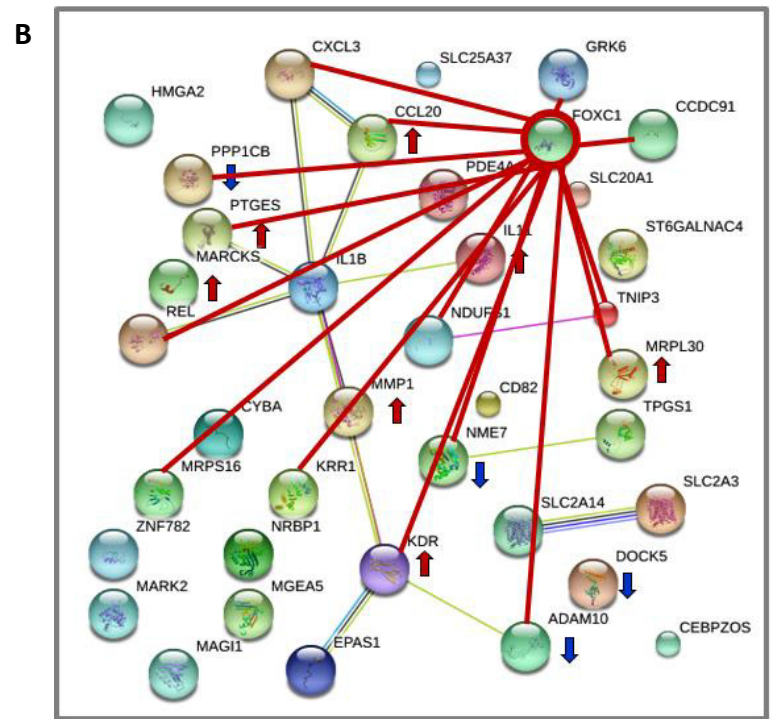
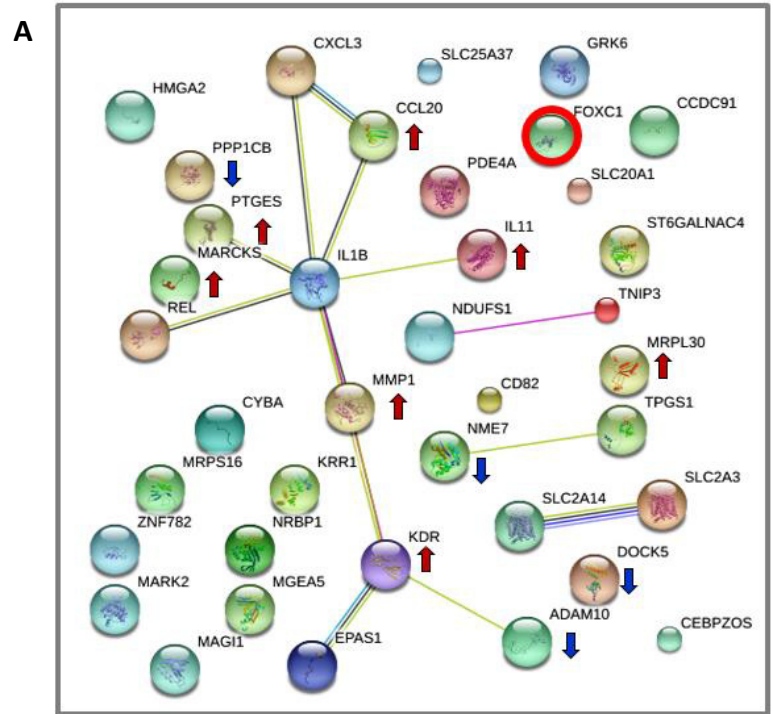


Figura 15. Red de interacciones predicha en STRING de los genes diferencialmente expresados por el silenciamiento de FOXC1. a) FOXC1 parece no tener interacciones génicas, b) Interacciones de FOXC1 sugeridas con los genes predichos con sitios de unión. Con flechas rojas se señalan los genes sobreexpresados y con flechas azules los genes subexpresados. Las líneas rojas indican las interacciones sugeridas.

De los 17 genes diferencialmente expresados por efecto de la sobreexpresión de FOXC1, se identificaron 9 genes con sitios de unión a FOXC1 (Tablas 13,14 y 15).

Tabla 15. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en MatInspector.

| Símbolo del gen | Cromosoma | Posición de inicio | Posición final | Cadena | Matriz. Sim | Secuencia |
|-----------------|-----------|--------------------|----------------|--------|-------------|-------------------|
| GNPTG | chr16 | 276 | 292 | - | 0.879 | gttgaGTGAataaacac |

Tabla 16. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en PATCH.

| Símbolo del gen | Cromosoma | Position | Mismatches | Score | Binding Factor |
|-----------------|-----------|----------|------------|-------|----------------|
| TPI1 | chr1 | 438 (-) | 1 | 90 | GTAATAAAGA |

Tabla 17. Genes con sitio blanco de FOXC1 identificados en JASPAR.

| Símbolo del gen | Score | Relative score | Start | End | Strand | predicted site sequence |
|-----------------|--------|-------------------|-------|-----|--------|-------------------------|
| DYNC1LI1 | 10.636 | 0.913873919946643 | 434 | 444 | 1 | agggtaaaca |
| FNDC3B | 14.033 | 0.964866354102554 | 710 | 720 | 1 | tgagtaacat |
| HIBCH | 10.426 | 0.910721605795114 | 465 | 475 | 1 | tgtgtcaatac |
| MDM2 | 10.669 | 0.914369283599026 | 698 | 708 | 1 | agtgtaaacac |
| | 10.395 | 0.91025626418227 | 713 | 723 | 1 | aatacaaacat |
| MTO1 | 12.761 | 0.945772336956154 | 804 | 814 | 1 | aaaataaataa |
| RAP1A | 10.361 | 0.909745889510117 | 34 | 44 | 1 | tatctaaataa |
| SERF1A | 12.858 | 0.947228405873765 | 171 | 181 | 1 | tatgtaaacag |

Similarmente se realizó un análisis de interacciones en STRING con todos los genes identificados en el protocolo de sobreexpresión. No se observó interacción entre FOXC1 con los genes identificados (Figura 16a). Sin embargo, aún existe la posibilidad, hasta comprobarse lo contrario, que dichos genes sean regulados por la unión de FOXC1 a sus sitios de unión.

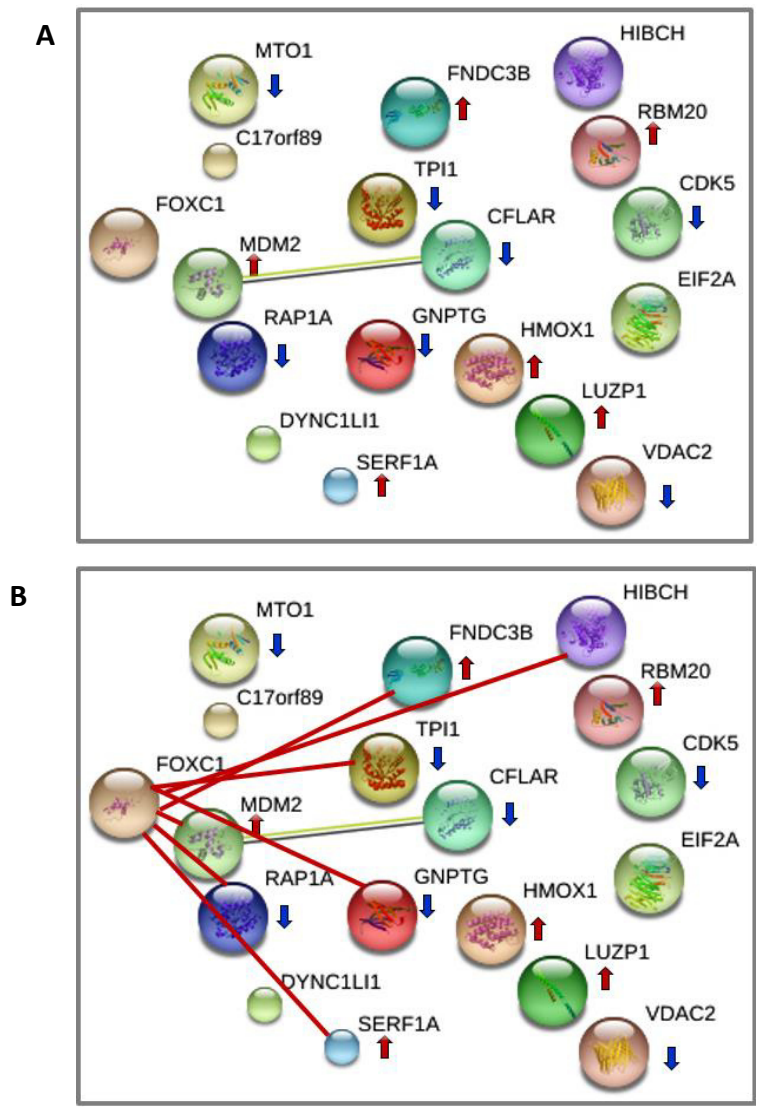


Figura 16. Red de interacciones predicha en STRING de los genes diferencialmente expresados por la sobreexpresión de FOXC1. a) FOXC1 parece no tener interacciones génicas, b) Interacciones de FOXC1 sugeridas con los genes predichos con sitios de unión. Con flechas rojas se señalan los genes sobreexpresados y con flechas azules los genes subexpresados. Las líneas rojas indican las interacciones sugeridas.

CAPÍTULO 9 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la expresión elevada de FOXC1 se asocia con un mal pronóstico, con progresión y metástasis en cáncer de mama en especial en el subtipo basal (BLBC).

En este estudio identificamos un perfil de expresión de 39 genes asociados al silenciamiento de FOXC1 que incluyen 35 sobreexpresados y 4 subexpresados. Empleando análisis *in silico*, predijimos que, de los 39 genes identificados, 16 genes muestran sitios de unión a FOXC1. Se proponen los genes candidatos ADAM10, CXCL3 y KDR que participan en el desarrollo del cáncer promoviendo la proliferación de las células. ADAM10 es una proteasa que escinde a la E-cadherina y la molécula de adhesión L1 promoviendo la invasión, metástasis y proliferación por la escisión de estas moléculas que participan en las uniones célula-célula (M. Mullooly et al., 2015; B. You, et al., 2015). Por otro lado, identificamos a la CXCL3 una quimiocina que se unen a los receptores de quimioquinas en la superficie de las células endoteliales y por lo tanto, promueve la angiogénesis (Purvaba J. Sarvaiya et al., 2013). Además, se evidenció al gen KDR el cual es uno de los dos receptores de VEGF e impulsa la proliferación inducida por VEGF favoreciendo la supervivencia y la migración de las células. De interés, se ha reportado que el silenciamiento de KDR suprime el crecimiento tumoral (Zhang X et al, 2014).

Desde un punto de vista integrativo, proponemos que los genes asociados al silenciamiento de FOXC1 participan en el desarrollo de inflamación y en el microambiente del inflamatorio del tumor.

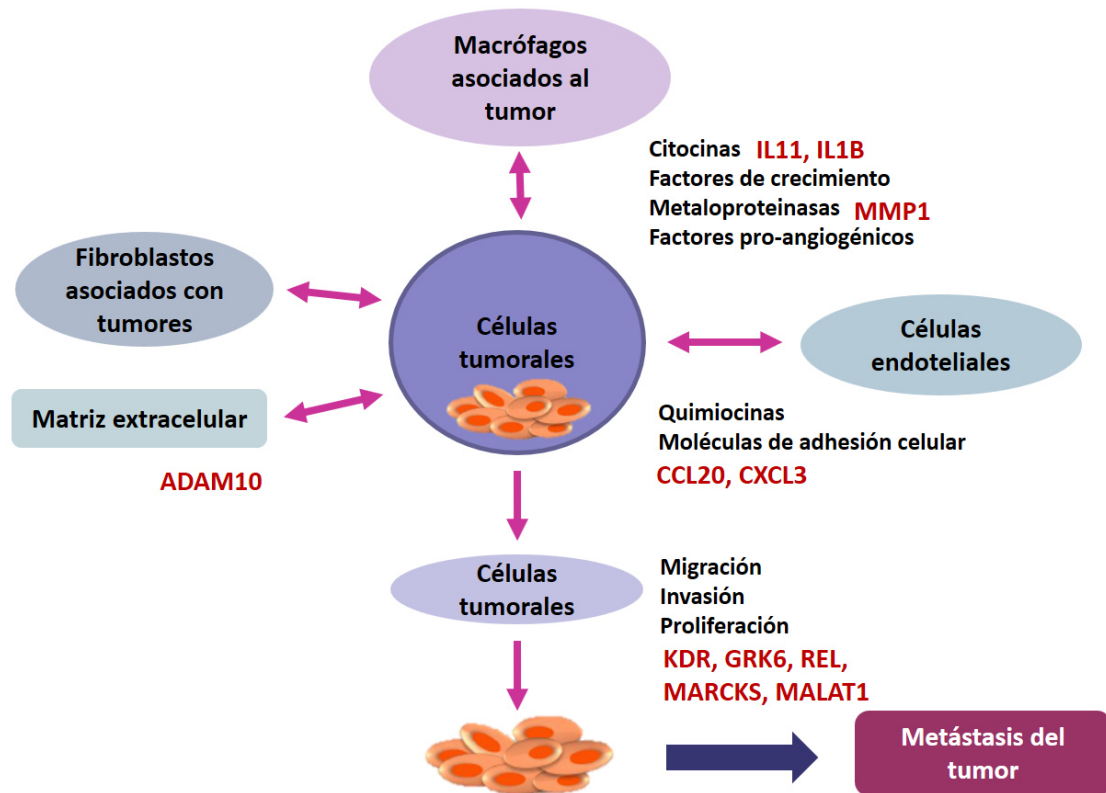
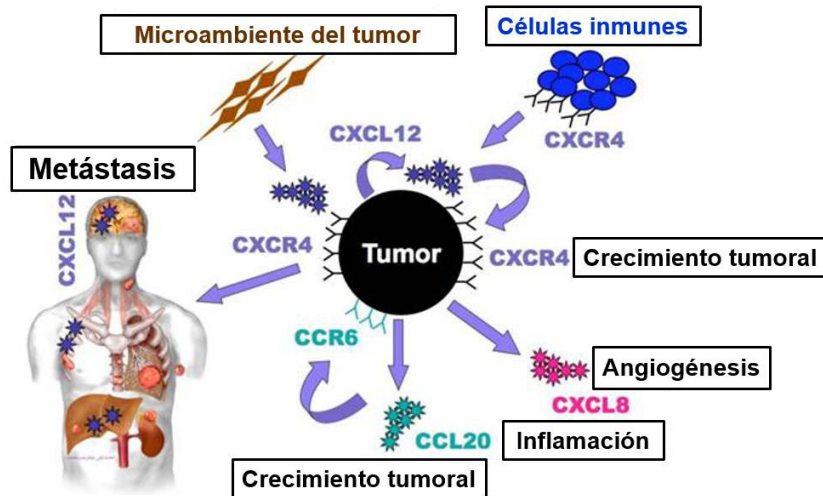


Figura 17. Genes asociados al silenciamiento de FOXC1 y microambiente inflamatorio del tumor. En rojo aparecen los genes predichos con sitios de unión a FOXC1. En nuestra propuesta de integración, planteamos que el microambiente inflamatorio del tumor promueve la expresión de proteasas (ADAM10) y metaloproteasas (MMP1) para la degradación de la matriz extracelular y posterior invasión, además de citocinas (IL11, IL1B) y quimiocinas (CCL20, CXCL3) para la evasión del sistema inmune y secretar factores proangiogénicos que estimulen la angiogénesis e impulse la proliferación y migración de las células tumorales.

El microambiente inflamatorio del tumor (Figura 17) se compone principalmente de fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y matriz extracelular. Este entorno inflamatorio que rodea a un tumor promueve la ruptura de la membrana basal, en donde están implicadas proteasas como ADAM10 que escinde E-cadherina necesaria para la adhesión célula-célula y metaloproteasas como MMP1 que degrada la matriz extracelular, procesos necesarios para la migración y la invasión de las células. A su vez las células tumorales son capaces de producir citocinas (IL11, IL1B) y quimiocinas como CCL20 que facilitan la evasión del sistema inmune y CXCL3 que estimulan la producción de factores

proangiogénicos promoviendo la angiogénesis. Finalmente, como resultado de todos estos procesos se impulsa la proliferación, migración e invasión de las células tumorales donde están implicados genes blanco de FOXC1 como: KDR, GRK6, REL, MARCKS y MALAT1 lo que conduce a la metástasis del tumor.



Hisaki Hayashi and Tsutomu Kume, 2008; O. Wald et al., 2013

Figura 18. Funciones de CXCR4 / CXCL12 en NSCLC potencialmente reguladas por FOXC1 que impulsan la metástasis en cáncer de mama. Las células tumorales de NSCLC expresan el receptor de quimiocinas CXCR4 y producen su ligando, la quimiocina CXCL12. Las interacciones CXCR4 / CXCL12 actúan localmente en formas autocrinas y paracrinas para aumentar el crecimiento del tumor primario y a su vez estimular la producción de quimiocinas adicionales tales como la quimiocina CCL20 (pro-inflamatoria y pro-proliferativa) y las quimiocinas CXCL1 e IL -8 (pro-angiogénica y pro-proliferativa) promoviendo la angiogénesis y conduciendo a la metástasis. Nosotros identificamos que FOXC1 puede potencialmente regular algunas de estas quimiocinas por lo que proponemos que dichas quimiocinas también conducen a la metástasis en cáncer de mama.

Wald et al., 2013 reportaron que en el microambiente tumoral en cáncer de pulmón de células no pequeñas se produce la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4, y que a su vez se estimula la producción de otras quimiocinas que impulsan el crecimiento del tumor y la angiogénesis, conduciendo a la metástasis. En nuestro trabajo se identificó que FOXC1 puede potencialmente regular algunas de estas quimiocinas por lo que proponemos que dichas quimiocinas también conducen a la metástasis en cáncer de mama. Nuestros datos apoyan

el trabajo de Hisaki Hayashi and Tsutomu Kume, 2008 quienes reportaron que FOXC1 regula la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 (Figura 18).

Por otro lado, identificamos un perfil de expresión de 17 genes asociados a la sobreexpresión de FOXC1, 10 sobreexpresados y 7 subexpresados. De estos genes mediante análisis *in silico* predijimos 9 genes con sitios de unión a FOXC1. Nuestros candidatos más importantes son los genes MDM2, FNDC3B y HIBCH. MDM2 presenta la mayor sobreexpresión y es un oncogén que inhibe la función de p53 y por lo tanto, induce la evasión de la apoptosis (Figura 19), además de promover la motilidad celular y la invasión mediante el control de la degradación de E-cadherina (D. A. Turbin et al, 2006; J. Yang et al., 2006). Por otro lado, encontramos sobreexpresado el gen FNDC3B, un oncogén, cuya sobreexpresión se encontró que es capaz de transformar malignamente células mamarias, inducir la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y por lo tanto promover la migración celular y la metástasis (C. Cai et al., 2013; C. Lin et al., 2016).

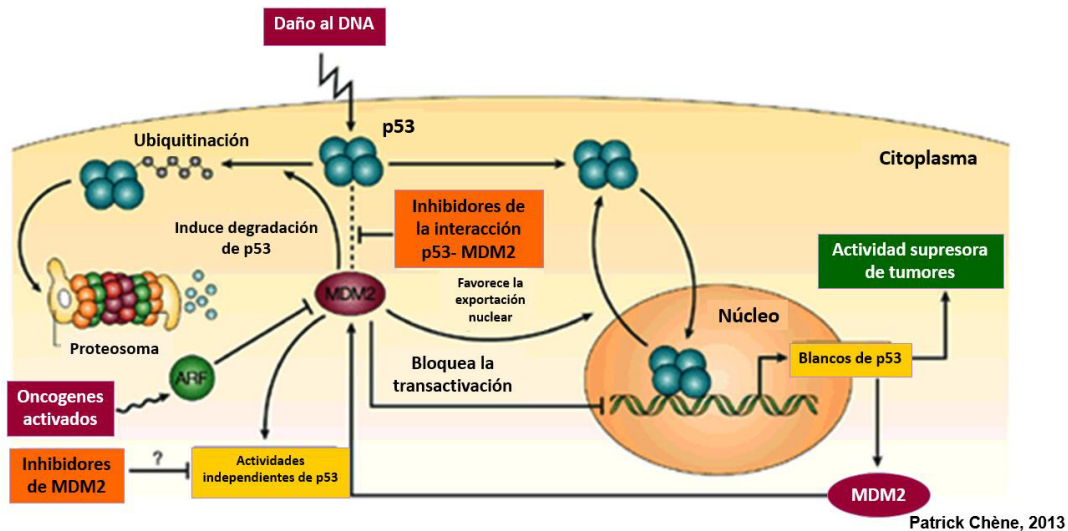


Figura 19. Rol de MDM2 y FNDC3B. Cuando hay un daño en el DNA p53 se induce con actividad supresora de tumores, sin embargo, en cáncer se activan oncogenes que impiden la degradación de MDM2. Proponemos que la sobreexpresión de FOXC1 induce la sobreexpresión de MDM2 y de esta manera MDM2 como ligasa de ubiquitina induce la degradación de p53 por el proteosoma estimulando la evasión de la apoptosis. Por otro lado, MDM2 puede inducir la degradación de la E-cadherina interrumpiendo la adhesión célula-célula promoviendo la TEM, la migración y finalmente la metástasis.

Finalmente, identificamos la sobreexpresión de la enzima HIBCH (3-hidroxiisobutiril-CoA-hidrolasa). HIBCH participa en la degradación de aminoácidos hidroliza a hidroxibutiril coenzima A (Prat A et al., 2014) y conduce a la formación de Succinil-CoA que potencialmente puede alimentar al ciclo de Krebs e inducir producción de energía y la progresión de las células cancerígenas (Figura 20).

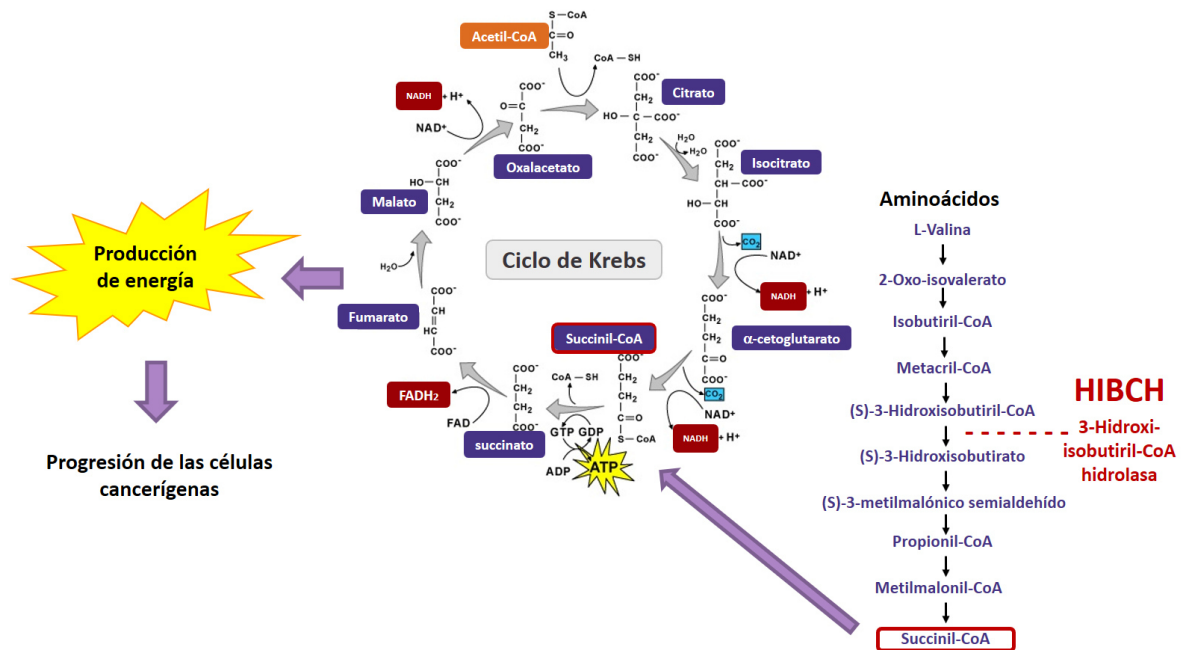


Figura 20. Rol de HIBCH. La 3-hidroxiisobutiril-CoA-hidrolasa (HIBCH) participa durante la degradación de aminoácidos, hidrolizando 3-hidroxiisobutiril-CoA contribuyendo a la producción de Succinil-CoA que alimenta al ciclo de Krebs y potencialmente puede inducir producción de energía y por lo tanto la progresión de las células tumorales.

Uno de los puntos débiles de nuestro estudio muestra que los grupos de genes regulados por FOXC1 identificados en los ensayos de sobreexpresión y silenciamiento no se comparten.

Para la sobreexpresión de FOXC1, empleamos una línea celular que subexpresara FOXC1, por lo cual, se usó la línea triple negativo primaria HCC1395, mientras que para el silenciamiento empleamos una línea celular que sobreexpresara FOXC1 por lo que se usó la línea triple negativo metastásica

MDA-MB-231. En este sentido muchos de los genes que se identificaron como CXCL3, KDR, ADAM y MDM2 intervienen en mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de metástasis, proliferación y la invasión en cáncer de mama triple negativo. Hipotetizamos que es potencialmente probable que las diferencias en la expresión selectiva de genes involucrados en el desarrollo de cáncer de mama bien pudieran relacionarse con el hecho de que durante los ensayos de sobreexpresión y silenciamiento de FOXC1 se empleó un fenotipo diferente de líneas celulares. Esta propuesta es apoyada por trabajos previos de nuestro laboratorio realizados por la MC. Claudia Aguayo quien analiza estas dos líneas de cáncer de mama, demostró que la expresión de los genes es diferente entre el fenotipo primario y el fenotipo metastásico, similar a lo encontrado en nuestro trabajo.

CAPÍTULO 10 CONCLUSIÓN

Identificamos al menos 56 genes regulados por FOXC1. Algunos de estos genes (N=25), tienen sitios de unión en sus promotores (directamente regulados), mientras que otros (N=31) no (indirectamente regulados).

Encontramos al menos 11 genes (CCL20, CXCL3, ADAM10 y KDR, GRK6, REL, MARCKS, MALAT1, HIBCH, FNDC3B y MDM2) potencialmente blanco de FOXC1, que participan en la inflamación como las quimiocinas **CCL20** y **CXCL3** que aumentan el crecimiento de las células tumorales y genes como la proteasa **ADAM10** y **KDR**, el receptor de VEGF, y otros como **GRK6**, **REL**, **MARCKS** y **MALAT1** que promueven la invasión y la metástasis. Por otro lado, también encontramos genes involucrados en el metabolismo energético como la enzima 3-hidroxiisobutil-CoA-hidrolasa (**HIBCH**) que potencialmente puede contribuir a la producción de energía. Además, identificamos al gen **FNDC3B** el cual puede inducir la transición epitelio-mesenquimal. De manera relevante, demostramos que un posible blanco de FOXC1 es el oncogén **MDM2**, el cual regula a p53 promoviendo su degradación y conduciendo a la evasión de la apoptosis un mecanismo esencial para la progresión del cáncer.

Los datos generados en este trabajo posiblemente pueden explicar por qué aquellos tumores de cáncer de mama, con sobreexpresión de FOXC1, presentan fenotipos más agresivos, con mayor progresión a metástasis y por lo tanto un peor pronóstico.

Para validar el análisis de expresión por microarreglos de los genes tanto del silenciamiento como de la sobreexpresión de FOXC1, se comprobará su expresión mediante PCR en tiempo real, y para validar el análisis *in silico* de genes blanco, se realizarán ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, que identificarán experimentalmente la regulación por FOXC1 de los posibles genes blanco determinados en este estudio.

CAPÍTULO 11 BIBLIOGRAFÍA

- Cai C, Rajaram M, Zhou X, et al. (2012). Activation of multiple cancer pathways and tumor maintenance function of the 3q amplified oncogene FNDC3B. *Cell Cycle*, 11(9):1773-1781.
- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14:1368–76.
- GeneCards, disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXC1>
- GLOBOCAN 2012, disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Hajjari M, Behmanesh M, Zeinoddini M. (2013). The significant aberrant expression of FOXC1 as a high specific and sensitive potential biomarker in gastric adenocarcinoma tumor tissues. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 15: 1-7.
- Hayashi H, Kume T. (2008). Forkhead transcription factors regulate expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells and CXCL12-induced cell migration. *Biochemical and biophysical research communications*, 367(3):584-589.
- Jensen TW, Ray T, Wang J, Li X, Naritoku WY, Han B, Bellafiore F, Bagaria SP, Qu A, Cui X, Taylor CR, Ray PS. (2015). Diagnosis of Basal-Like Breast Cancer Using a FOXC1-Based Assay. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(8): djv148.
- Jin Y, Han B, Chen J, Wiedemeyer R, Orsulic S, Bose S, Zhang X, Karlan BY, Giuliano AE, Cui Y, Cui X. (2014). FOXC1 is a critical mediator of EGFR function in human basal like breast cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 21: S758-766.
- Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. (2013). Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature Reviews Cancer*, 13(7):482-95.
- Lin C-H, Lin Y-W, Chen Y-C, et al. (2016). FNDC3B promotes cell migration and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(31):49498-49508.
- Mullooly M, McGowan PM, Kennedy SA, et al. (2015) ADAM10: a new player in breast cancer progression? *British Journal of Cancer*, 113(6):945-951.
- Prat A, Cruz C, Hoadley KA, Díez O, Perou CM, Balmaña J. (2014). Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(1):185-191.

- Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, El-Sayed ME, Benhasouna A, Brunet JS, Akslen LA, Evans AJ, Blamey R, Reis-Filho JS, Foulkes WD, Ellis IO. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clinical Cancer Research*, 15:2302–10.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. (2008). Basal-like breast cancer: A critical review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15):2568–2581.
- Ray PS, Bagaria SP, Wang J, Shamonki JM, Ye X, Sim MS, Steen S, Qu Y, Cui X, Giuliano AE. (2011). Basal-Like Breast Cancer Defined by FOXC1 Expression Offers Superior Prognostic Value: A Retrospective Immunohistochemical Study. *Annals of Surgical Oncology*, 18:3839–3847.
- Ray PS, Wang J, Qu Y, Sim MS, Shamonki J, Bagaria SP, Ye X, Liu B, Elashoff D, Hoon DS, Walter MA, Martens JW, Richardson AL, Giuliano AE, Cui X. (2010). FOXC1 Is a Potential Prognostic Biomarker with Functional Significance in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Research*, 70(10).
- Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, 68:989–97.
- Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4(12):2171-2185.
- Secretaría de Salud. (2015). Estadísticas Cáncer de Mama, disponible en: <http://www.gob.mx/salud/documentos/estadisticas-cancer-de-mama?state=published>
- Sizemore ST, Keri RA. (2012). The Forkhead Box Transcription Factor FOXC1 Promotes Breast Cancer Invasion by Inducing Matrix Metalloprotease 7 (MMP7) Expression, 287(29):24631-40.
- Tamimi Y, Lines M, Coca-Prados M, Walter MA. (2004). Identification of Target Genes Regulated by FOXC1 Using Nickel Agarose–Based Chromatin Enrichment, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45:11.
- Tkocz D, Crawford NT, Buckley NE, Berry FB, Kennedy RD, Gorski JJ, Harkin DP, Mullan PB. (2012). BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene*, 31: 3667–3678.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65:87-108.

- Turbin DA, Cheang MC, Bajdik CD, Gelmon KA, Yorida E, De Luca A, Nielsen TO, Huntsman DG, Gilks CB. (2006). MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma, *Modern Pathology*, 19, 69–74.
- Wald O, Shapira OM, Izhar U. (2013). CXCR4/CXCL12 Axis in Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathologic Roles and Therapeutic Potential. *Theranostics*, 3(1):26-33.
- Wang J, Ray PS, Sim MS, Zhou XZ, Lu KP, Lee AV, Lin X, Bagaria SP, Giuliano A, Cui X. (2012). FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF-κB signaling. *Oncogene*, 8; 31(45): 4798–4802.
- Xu G, Li K, Zhang N, Zhu B, Feng G. (2016). Screening Driving Transcription Factors in the Processing of Gastric Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, Volume 2016, Article ID 8431480, 9 pages.
- Yang J-Y, Zong CS, Xia W, et al. (2006). MDM2 Promotes Cell Motility and Invasiveness by Regulating E-Cadherin Degradation. *Molecular and Cellular Biology*.;26(19):7269-7282.
- You B, Shan Y, Shi S, Li X, You Y. (2015). Effects of ADAM10 upregulation on progression, migration, and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Science*, 106(11):1506-1514.
- Yuan NA, Meng M, Liu C, Feng L, Hou L, Ning Q, Xin G, Pei L, Gu S, Li X, Zhao X. (2014) Clinical characteristics and prognostic analysis of triple-negative breast cancer patients. *Molecular and Clinical Oncology*; 2:245-251.
- Zhang X, Ge YL, Zhang SP, et al. 2014. Downregulation of KDR expression induces apoptosis in breast cancer cells. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 19(4): 527-541.
- Zuo HD, Yao WW. (2016). The role and the potential regulatory pathways of high expression of forkhead box C1 in promoting tumor growth and metastasis of basal-like breast cancer. *JBUON*, 21(4):818-825.
- Xuo HD, Yao WW. (2016). The role and the potential regulatory pathways of high expression of forkhead box C1 in promoting tumor growth and metastasis of basal-like breast cancer. *JBUON*, 21(4):818-825.

ANEXO 1

Silenciamiento de FOXC1 con el Kit Silencer® siRNA Transfection II (Cat# AM1631, Ambion)

1. Preparar las células

- a. Tripsinizar las células adherentes, sanas, en crecimiento, utilizando el procedimiento de rutina.
- b. Inactivar la tripsina resuspendiendo las células en medio de crecimiento normal y mantener las células a 37 ° C mientras se preparan los complejos de transfección.

2. Preparar los complejos de siRNA/agente de transfección.

Primero llevar a temperatura ambiente tanto el agente de transfección y el medio OPTI-MEM I antes de su uso.

- a. Diluir el agente de transfección en medio OPTI-MEM I de acuerdo a la siguiente tabla:

| Placa | 96 pozos | | 6 pozos | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Agente | siPORT NeoFX | siPORT Amine | siPORT NeoFX | siPORT Amine |
| µL de agente de transfección | 0.5 | 0.3 | 5 | 5 |
| µL de OPTIMEM I | 10 | 10 | 100 | 100 |

- b. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- c. Diluir el siRNA de FOXC1, el siRNA de GAPDH como control positivo y el siRNA scramble como control negativo en medio OPTI-MEM I para obtener una concentración final de 30 nM en la transfección de acuerdo a la siguiente tabla:

| Placa | 96 pozos | 6 pozos |
|------------------------------------------------------|----------|---------|
| μL del stock de siRNA [20 μM] | 0.15 | 3.75 |
| μL de OPTI-MEM I | 10 | 100 |

d. Combinar el siRNA diluido y el agente de transfección diluido e incubar la mezcla se a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la formación de los complejos de transfección.

e. Colocar 20 μL de complejos de siRNA/agente de transfección en cada pozo de una placa de 96 pozos.

NOTA: Incluir como controles 20 μL conteniendo OPTI-MEM I y sólo el agente de transfección o sólo el siRNA de FOXC1.

3. Mezclar las células con los complejos de siRNA/agente de transfección.

a. A cada pozo de la placa de cultivo que contienen los complejos, trasferir 80 μL de medio sin antibiótico conteniendo 30 000 células.

b. Mezclar suavemente las células y los complejos oscilando la placa de ida y vuelta para distribuir uniformemente los complejos, evitando remolinos.

4. Incubar la placa a 37 °C, hasta el momento del ensayo.

ANEXO 2

Extracción de RNA total con PureZOL™ (Bio-Rad)

1. Agregar 1 mL de PureZOL™ por cada 10 cm² de área de placa. Pipetear hacia arriba y abajo varias veces.
2. Incubar el lisado 5 min a temperatura ambiente y transferir a un tubo eppendorf.
3. Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, puede ser almacenada a -70 °C durante 1 mes. Nota: Para procesar los lisados congelados, las muestras deben descongelarse a temperatura ambiente
4. Incubar 10 min a 55°C.
5. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 µL de cloroformo y agitar enérgicamente 15 seg. (sin vórtex).
7. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4°C.
9. Transferir la fase acuosa (RNA-transparente) a un tubo nuevo.
10. Agregar 500 µL de isopropanol, dar vórtex e incubar 5 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4°C. El RNA aparece como un pellet blanco en la parte inferior del tubo.
12. Descartar el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol al 70-75% (en agua DEPC) para lavar el pellet (Se puede dejar a 4°C 1 semana o a -20°C 1 año).
13. Vortexear y centrifugar a 7,500 g 5 min a 4°C.
14. Descartar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente por 5 min (no dejar que el pellet se seque por completo).
15. Resuspender en 40 µL de agua DEPC estéril. Pipetear arriba y abajo varias veces.
16. Calentar en el termomixer a 55°C por 10 min para disolver completamente el RNA.

ANEXO 3

Purificación del RNA en columna con el kit “RNeasy MinElute cleanup kit (50) Qiagen” Cat. 74204

1. Preparar el mix DNasa y buffer (reactivos del kit “RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit” de QIAGEN).
2. Mezclar por cada muestra en un tubo de microcentrífuga
 - 87.5 μ L de RNA
 - 10 μ L de buffer RDD
 - 2.5 μ L de solución de stock de DNasa IHasta completar un volumen total de 100 μ L.
3. Incubar la mezcla 10 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 350 μ L de buffer RTL y mezclar.
5. Agregar 250 μ L de alcohol etílico absoluto y mezclar por pipeteo.
6. Transferir la mezcla (700 μ L) a la columna dentro del tubo, cerrar la tapa y centrifugar a 8,000 g por 20 seg. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
7. Agregar 500 μ L de buffer RPE a la columna y centrifugar a 8,000 g por 20 seg. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
8. Agregar 500 μ L de alcohol etílico al 80% y centrifugar a 8,000 g por 2 min. Descartar el tubo y poner uno nuevo.
9. Con la tapa abierta centrifugar la columna a toda velocidad por 5 min. Descartar el tubo y poner la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL.
10. Agregar 30 μ L de agua libre de RNasa en el centro de la columna (caliente a 60°C) y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad.
11. Repetir el mismo pasó utilizando el mismo eluido para obtener un RNA más concentrado.
12. Almacenar la muestra a -80°C hasta su uso.

ANEXO 4

Transformación de células competentes

1. A 100 μL de células competentes *E. coli* DH5 α (tratadas con CaCl_2) agregar 1 mL de plásmido a una concentración de 10 ng/ μL .
2. Incubar 30 min en hielo (máximo 45 min).
3. Incubar 30 seg. a 42°C (o puede incubarse 40 seg. a 37°C).
4. Enseguida incubar 2 min en hielo.
5. Agregar 900 μL de medio LB sin antibiótico e incubar con agitación a 37°C durante una hora.
6. Plaquear 100 μL en agar LB con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e incubar a 37°C toda la noche
7. Al día siguiente, seleccionar colonias aisladas, e inocular en 10 mL de caldo LB con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], dejar crecer a 37°C con agitación durante toda la noche y proceder a purificar el DNA plasmídico.

ANEXO 5

“Purificación de DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep Qiagen” Cat. 27104

1. Centrifugar el cultivo bacteriano a > 8000 rpm ($6800 \times g$) durante 3 min a temperatura ambiente ($15-25$ °C).
2. Resuspender las células bacterianas sedimentadas en 250 μ l de buffer P1 y transferirlas a un tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 250 μ l de buffer P2 y mezclar completamente invirtiendo el tubo de 4-6 veces hasta que la solución quede clara. No permitir que la reacción de lisis continúe durante más de 5 min.
4. Añadir 350 μ l de buffer N3 y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo de 4-6 veces.
5. Centrifugar durante 10 min a $13,000$ rpm ($\sim 17,900 \times g$).
6. Colocar 800 μ l del sobrenadante del paso 5 a la columna de centrifugado QIAprep 2.0. Centrifugar durante 30-60 s y descartar el flujo.
7. Lavar la columna añadiendo 0.5 mL de buffer PB. Centrifugar durante 30-60 s y descartar el flujo.
8. Lavar la columna de centrifugado QIAprep 2.0 añadiendo 0.75 mL de tampón PE. Centrifuga durante 30-60 s y descartar el flujo. Transferir la columna a un tubo de colecta.
9. Centrifugar durante 1 min para eliminar el buffer de lavado residual.

10. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 L limpio. Para eluir el DNA, añadir 50 µl de tampón EB (TrisCl 10 mM, pH 8,5) o agua al centro de la columna, dejar reposar durante 1 min y centrifugar durante 1 min. Almacenar a -20°C hasta su uso.

ANEXO 6

Sobreexpresión de FOXC1 con el Kit Xfect™ Single Shots (Midi) Protocol-At-A-Glance (Clontech)

1. Preparar las células un día antes de la transfección
 - a. Tripsinizar las células adherentes, sanas, en crecimiento, utilizando el procedimiento de rutina.
 - b. Plaquear las células en 1-2 mL de medio de crecimiento completo en placa de 6 pozos de modo que las células alcancen de un 50-70% de confluencia en el momento de la transfección.
2. En un tubo de microcentrífuga estéril, diluir 5 µg de DNA plasmídico con agua estéril hasta un volumen final de 100 µl. Mezclar bien por vórtex.
3. Añadir los 100 µl de DNA diluido a un tubo de Xfect Single Shots, y vortexear bien a alta velocidad durante 10 seg. El pellet debe disolverse completamente.
4. Incubar las muestras durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de nanopartículas. Después de los 10 min de incubación, centrifugar el tubo durante 2 segundos para recoger el contenido en la parte inferior del tubo.
5. Añadir los 100 µl de complejos de nanopartículas, gota a gota, al cultivo celular preparado en el Paso 1. Oscilar la placa suavemente hacia adelante y hacia atrás para mezclar.

6. Incubar las células a 37 °C durante 4 horas.

7. Remover los complejos de las células por aspiración, remplazar con 2.5 mL de medio de crecimiento completo fresco y devolver las células a la incubadora a 37°C hasta el momento del análisis. El pico de expresión se alcanza típicamente a las 48 horas.

ANEXO 7

Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

Día 1

Etapa 1: Preparar los controles RNA poli-A

NOTA:

- Precalear el termociclador a 42°C
- Sacar los reactivos a descongelar, el buffer de Dil de poli-A control puede tardar de 15 a 20 minutos para descongelarse a TA.
- Evitar pipetear menos de 2 µL de volumen

| Total RNA Input Amount | Serial Dilutions | | | | Volume of 4 th Dilution to Add to Total RNA |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|
| | 1 st Dilution | 2 nd Dilution | 3 rd Dilution | 4 th Dilution | |
| 250 ng | 1:20 | 1:50 | 1:50 | 1:4 | 2 µL |

Preparar las diluciones de poli-A RNA control para 250 ng de RNA total:

1. Añadir 2 µL de poli-A RNA Control Stock a 38 µL de Buffer Dil para la 1^a dilución (1:20).
2. Añadir 2 µL de la 1^a dilución a 98 µL de Buffer Dil para la 2^a dilución (1:50).
3. Añadir 2 µL de la 2^a dilución a 98 µL de Buffer Dil para la 3^a dilución (1:50).
4. Añadir 5 µL de la 3^a dilución a 15 µL de Buffer Dil para la 4^a dilución (1:4).

Después de cada paso
vórtex y spin.

Etapa 2: Preparar la mezcla de RNA Total /Poly-A RNA Control

| Componente | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| RNA Total (250 ng) | | | | |
| Control Poly-A (4 ^{ta} dil) | 2 µL | 2 µL | 2 µL | 2 µL |
| Agua | | | | |
| Volumen total | 5 µL | | | |

Etapa 3: Síntesis de la primera cadena de cDNA

1. En un cooler, preparar el Master Mix. **Vórtex y spin.**

| Componente | 1 r'xn |
|------------------------|--------|
| Buffer 3' First-Strand | 4 µL |
| Enzima 3' First-Strand | 1 µL |
| Volumen Total | 5 µL |

2. Transferir 5 µL de Master Mix a un tubo. Volumen final de reacción de 10 µL. **Vórtex y spin.**

3. Incubar

| Síntesis de primera cadena | T° y duración |
|----------------------------|---------------|
| Etapa 1 | 42°C 120 min |
| Etapa 2 | 4°C 2 min |

4. Después de la incubación **vórtex y spin.** Colocar la muestra en hielo 2 min para enfriar el plástico. No exceder de 10 min.

Etapa 4: Síntesis de la segunda cadena de cDNA

NOTA: Pre-cool el termociclador a 16 °C.

1. En un cooler, preparar el Master Mix. **Vórtex y spin.**

| Componente | 1 r'xn |
|--------------------------|--------|
| Agua | 13 µL |
| Buffer 3' Second-Strand | 5 µL |
| Enzima 3' Second -Strand | 2 µL |
| Volumen Total | 20 µL |

2. En el cooler, transferir 20 μL de Master Mix a cada muestra (10 μL). Volumen final de reacción de 30 μL . **Vórtex y spin.**

3. Incubar

| Síntesis de segunda cadena | T° y duración |
|----------------------------|--------------------|
| Etapa 1 | 16°C 60 min |
| Etapa 2 | 65°C 10 min |
| Etapa 3 | 4°C 2 min |

4. Después de la incubación, dar un **spin**.

Etapa 5: Sintetizar cRNA marcado por Transcripción in vitro

NOTA:

- Transferir las muestras de la segunda cadena a TA \geq 5 min mientras se prepara el Master Mix IVT.
- Dejar el buffer IVT a TA durante \geq 10 minutos antes de preparar el Master Mix IVT.

1. Preparar IVT Mix Master a temperatura ambiente. **Vórtex y spin.**

| Componente | 1 r'xn |
|-----------------------|------------------------------------|
| Biotina 3' IVT | 4 μL |
| Buffer 3' IVT | 20 μL |
| Enzima 3' IVT | 6 μL |
| Volumen Total | 30 μL |

2. Transferir de 30 μL del Master Mix IVT a cada muestra (30 μL). Volumen final de reacción de 60 μL . **Vórtex y spin.**

3. Incubar 16 horas en el termomixer.

| Síntesis de segunda cadena | T° y duración |
|----------------------------|-------------------|
| Etapa 1 | 40°C 16 hr |
| Etapa 4 | 4°C hold |

4. Después de la incubación, dar un **spin**.

5. Coloque la reacción en un cooler y proceder a purificar el cRNA marcado.

Día 2. Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

Etapa 6: Purificar el cRNA marcado

NOTA:

- Realizar a temperatura ambiente.
- Precalentar el agua en el termociclador a 65 ° C al menos 10 min.
- Permitir que las perlas se equilibren a temperatura ambiente
- Preparar etanol al 80% fresco
- Transferir la muestra de cRNA a temperatura ambiente.

1. Vortex a las perlas de purificación para resuspender las partículas magnéticas.
2. Añadir 100 µL de las perlas a cada muestra de cRNA (60 µL) mezclar pipeteando arriba y abajo 10 veces, y transferir a un pozo de una placa de fondo en U.
3. Incubar durante 10 min. Cubrir la placa. El cRNA se une a las perlas de purificación.
4. Mover la placa a un soporte magnético para capturar las perlas de purificación durante ~ 5 min. La mezcla es transparente, y las perlas forman pellets contra los imanes.
5. Aspirar con cuidado y desechar el sobrenadante sin perturbar las perlas de purificación.
6. **Lavar las perlas de purificación.** En el soporte magnético, añadir 200 µL de etanol 80% a cada pozo y se incuba durante 30 seg.
7. Poco a poco aspirar y desechar el etanol al 80% sin perturbar las perlas de purificación.
8. Realizar 3 lavados y eliminar completamente el etanol 80%.
9. Secar al aire en el soporte magnético durante 5 minutos hasta que no se vea líquido, el pellet aparece brillante.

Eluir cRNA.

1. Retire la placa del soporte magnético. Añadir a cada muestra 27 µL de agua precalentada (65 °C) e incubar durante 1 min. Se puede agregar un adicional de 10-30 µL de agua.

2. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo 10 veces.
3. Mover la placa al soporte magnético por ~ 5 min para capturar las perlas de purificación.
4. Transferir el sobrenadante, que contiene el cRNA eluido, a un tubo libre de nucleasa.
5. Colocar las muestras purificadas cRNA en el hielo, o inmediatamente congelar las muestras a -20 ° C para su almacenamiento.

Etapa 7: Evaluar rendimiento de cRNA

1. Medir absorbancia a 260 nm en NanoDrop.
2. Utilizar agua libre de nucleasa como blanco.
3. Utilizar 1.5 µL de la muestra de cRNA directamente.
4. Las muestras con concentraciones de cRNA superior a 3,000 ng / µL se deben diluir.

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cantidad de cRNA marcado requerido para fragmentación para un formato 49 de microarreglos |
| 15 µg (en 1 a 32 µL) |

Etapa 8: Fragmentar el cRNA marcado

1. En un cooler preparar la cantidad requerida de cRNA marcado (15 µg).
2. En un cooler preparar la reacción de fragmentación. Vortex y spin.

| Componente | Formato 49 |
|--------------------------------|-----------------------------|
| cRNA marcado | 15 µg (en 1 a 32 µL) |
| Buffer de fragmentación | 8 µL |
| Volumen Total | 40 µL |

3. Incubar

| Reacción de fragmentación | T° y duración |
|----------------------------------|-------------------------|
| Tapa | 94°C |
| Etapa 1 | 94°C 35 min |
| Etapa 2 | 4°C hold (2 min) |

4. Inmediatamente después de la incubación, dar un spin.
5. Colocar la muestra sobre hielo

Etapa 9: HIBRIDACIÓN

1. Encender el horno de hibridación, ajustar la temperatura a 45°C y las RPM a 60. Dejar que el horno se precaliente.
2. Equilibrar los microarreglos a temperatura ambiente antes de su uso. Etiquetar el microarreglo con el nombre de la muestra.
3. Calentar el buffer de pre-hibridación a temperatura ambiente.
4. A temperatura ambiente, descongelar los componentes para el Master Mix de hibridación.
5. Calentar los controles de hibridación 20X a 65 ° C por 5 min en el termomixer.
6. A temperatura ambiente, preparar el Master Mix de hibridación. **Vórtex y spin.**

| Componente | 1 r'xn |
|---------------------------------------------------------|----------|
| Control Oligo B2 (3 nM) | 3.7 µL |
| Controles de hibridación 20X (bioB, bioC, bioD, cre) | 11 µL |
| Mix de Hibridación 2X | 110 µL |
| DMSO | 22 µL |
| Agua | 43.9 µL |
| Volumen Total | 190.6 µL |

Pre-hibridación del microarreglo.

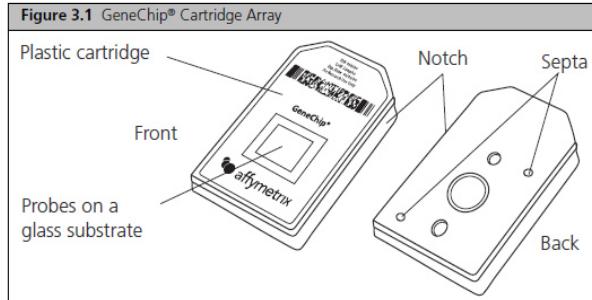
1. Insertar una punta de pipeta en el tabique superior derecho para permitir la ventilación.
2. Humedecer el microarreglo con un volumen apropiado de Mix de Pre-hibridación llenándolo a través del septo inferior izquierdo. Llenarlo verticalmente.

| Volumen de Mix de Pre-hibridación para cargar en un microarreglo de formato 49 |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 200 µL |

3. Retirar la punta de pipeta del tabique superior derecho del microarreglo.

NOTA: Revisar que el septo de llenado no tenga líquido. Secar con kim wipes.

4. Incubar el microarreglo con el Mix de Pre-hibridación a 45 °C con 60 rpm por 10 a 30 min.



Preparar el Cóctel de hibridación.

1. A temperatura ambiente, añadir el Master Mix de hibridación a cada muestra de cRNA fragmentado y marcado con biotina para preparar el Cóctel de hibridación. **Vórtex y spin.**

| Componente | 1 r'xn |
|----------------------------|-----------------|
| Master Mix de hibridación | 190.6 µL |
| cRNA marcado y fragmentado | 29.4 µL (11 µg) |
| Volumen Total | 220 µL |

2. Incubar

| Reacción de fragmentación | T° y duración |
|---------------------------|-------------------------|
| Tapa | 99°C |
| Etapas 1 | 99°C 5 min (termomixer) |
| Etapas 2 | 45°C 5 min (Horno) |

3. Después de la incubación, dar un **spin**.

Hibridar el microarreglo.

1. Retirar el microarreglo del horno de hibridación. Extraer el mix de pre-hibridación del microarreglo con una micropipeta.

2. Rellenar el microarreglo con el volumen apropiado del cóctel de hibridación.

| Volumen de coctel de hibridación para cargar en un microarreglo de formato 49 |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 200 µL |

3. Cubrir ambos septos con doble Tough-Spots 1/2" para minimizar la evaporación y/o prevenir fugas.

4. Colocar los microarreglos en las bandejas del horno de hibridación.

NOTA: Asegurarse de que la burbuja dentro de la cámara de hibridación flota libremente al girar para permitir que el cóctel de hibridación haga contacto con todas las partes del microarreglo.

5. **Incubar** a 45 ° C con rotación a 60 rpm durante **16 horas**.

Día 3. Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

Etapa 10: Lavado y tinción

1. Retirar los microarreglos del horno. Retirar los Tough-Spots.

2. Permitir que los microarreglos se equilibren a temperatura ambiente antes del lavado y la tinción.

3. Extraer el cóctel de hibridación de cada microarreglo.

4. Llenar cada microarreglo completamente con buffer de lavado A.

NOTA: los microarreglos pueden ser almacenados en el buffer de lavado A a 4°C durante un máximo de 3 horas antes de continuar con el lavado y la tinción

5. Colocar los viales en soportes de muestra en la estación de fluidos:

A. Coloque un vial (ámbar) conteniendo 600 µL de cóctel de tinción 1 en el soporte 1.

B. Coloque un vial (claro) conteniendo 600 µL de cóctel de tinción 2 en el soporte 2.

C. Coloque un vial (claro) conteniendo 800 µL de Holding Buffer en el soporte 3.

6. Lavar y teñir los microarreglos según el tipo de microarreglo.

| |
|----------------------------------------------------------------|
| Protocolo de fluidos para un microarreglo de formato 49 |
|----------------------------------------------------------------|

| |
|-------------------|
| FS450_0001 |
|-------------------|

7. Comprobar si hay burbujas de aire. Si hay burbujas de aire, llenar manualmente el microarreglo con Holding Buffer. Si no hay burbujas de aire, cubrir tanto los septos con 3/8" Tough-Spots.

Inspeccionar la superficie de vidrio del microarreglo y limpiar el polvo y / u otras partículas con un kim wipe antes de escanear.

Etapas 11: Escanear

Registrar la muestra y la información del microarreglo en el programa AGCC.