

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE GANKYRIN SOBRE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN EN UN
MODELO CELULAR DE CÁNCER DE VEJIGA

Por

MARÍA FERNANDA LÓPEZ OCHOA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

2024

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE GANKYRIN SOBRE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN EN UN
MODELO CELULAR DE CÁNCER DE VEJIGA

Comité de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides
Director de Tesis



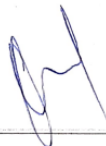
Dra. Vianey González Villasana
Secretario



Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Vocal



Dr. Santiago Saavedra Alonso
Vocal



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

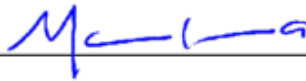
Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE GANKYRIN SOBRE
LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN EN UN
MODELO CELULAR DE CÁNCER DE VEJIGA

Dirección de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides
Director interno



Dra. María Elena Camacho Moll
Directora externa

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. María Elena Camacho Moll, por la confianza y la disposición para continuar siendo mi guía y con su experiencia, ser parte fundamental en mi formación. Al Dr. Mario Bermúdez por compartir su conocimiento y experiencia para alcanzar los objetivos; por su paciencia y siempre incentivarnos a continuar.

Igualmente, quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Pablo Zapata Benavides por su entendimiento, apoyo y supervisión durante la realización de este proyecto y desde hace ya varios años.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes se compartieron todo tipo de días. Gracias por el fuego amigo, el acompañamiento, por su disposición para ayudarme en los días más pesados, por las risas, las mañanas de tacos y más importante aún, por ofrecerme su amistad. Sin ustedes todo sería muy diferente, gracias.

A mi familia y amigos, por estar siempre presentes.

- “What we do now echoes in eternity” – Marco Aurelio

*Para ti, Vic.
Culmina una etapa más*

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. María Elena Camacho Moll y el Dr. Mario A. Bermúdez de León.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
1. Bases del cáncer de vejiga.....	4
2. Epidemiología del cáncer de vejiga.....	4
3. Tratamiento del cáncer de vejiga.....	5
4. Gankyrin.....	6
5. Transfección de la línea celular 5637.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIÓN.....	68
PERSPECTIVAS.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regulación de vías de señalización mediada por <i>Gankyrin</i> en cánceres humanos.....	17
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa del vector pQBI-25.....	19
Figura 2. Amplificación del fragmento específico del gen <i>Gankyrin</i>	26
Figura 3. Imagen representativa del vector pCR TM 2.1-TOPO.....	27
Figura 4. Identificación de candidatos por PCR de colonias.....	28
Figura 5. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp del vector pCR2.1TOPO + GANK.....	29
Figura 6. Análisis de integridad del ADN del vector pCR2.1TOPO + GANK.....	30
Figura 7. Caracterización enzimática del vector pCR2.1TOPO + GANK con NheI....	31
Figura 8. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp del vector pCR2.1TOPO + GANK.....	32
Figura 9. Análisis de integridad del ADN del vector pCR2.1TOPO + GANK.....	33
Figura 10. Caracterización y determinación de la fidelidad del inserto en la construcción pCR2.1TOPO + GANK.....	34
Figura 11. Imagen representativa del vector pQBI-25 / Cuantificación y pureza de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25.....	35
Figura 12. Análisis de integridad del ADN de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25.....	36
Figura 13. Digestión enzimática de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 con NheI.....	37
Figura 14. Digestión enzimática de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 con NheI / Cuantificación y pureza de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25....	38
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1 % del material purificado.....	39
Figura 16. Identificación de candidatos por PCR de colonias.....	41
Figura 17. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK.....	42
Figura 18. Análisis de integridad del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK....	43
Figura 19. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI.....	44
Figura 20. Análisis <i>in silico</i> de la digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI.....	45

Figura 21. Amplificación del fragmento específico del gen <i>Gankyrin</i>	46
Figura 22. Caracterización y determinación de la fidelidad del inserto en la construcción pQBI-25 + GANK.....	47
Figura 23. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con BamHI...	48
Figura 24. Análisis <i>in silico</i> de la digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI.....	49
Figura 25. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI.....	50
Figura 26. Cuantificación y pureza pQBI-25 + GANK / Análisis de integridad de la construcción pQBI-25 + GANK.....	52
Figura 27. Microscopía por contraste de fases de la línea celular 5637 transfectada con las construcciones pQBI-25 + GANK sentido y antisentido.....	53
Figura 28. Cuantificación y pureza del ARN total de células transfectadas con las construcciones pQBI-25 + GANK sentido y antisentido.....	54
Figura 29. Análisis de integridad del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK...	55
Figura 30. Amplificación del fragmento específico del gen <i>GAPDH</i>	56
Figura 31. Amplificación del fragmento específico del gen <i>Gankyrin</i>	57
Figura 32. Amplificación de <i>Gankyrin</i> y <i>GAPDH</i> en la línea celular 5637.....	59
Figura 33. Cuantificación de los niveles de expresión relativos de <i>Gankyrin</i> en la línea celular 5637.....	60
Figura 34. Inmunodetección de <i>Gankyrin</i> por western blot en la línea celular 5637....	61
Figura 35. Análisis densitométrico de la expresión de <i>Gankyrin</i> en células 5637.....	62
Figura 36. Análisis de la expresión de <i>Gankyrin</i> sobre la viabilidad de las células 5637 / Viabilidad de células 5637 con sobreexpresión e inhibición de <i>Gankyrin</i>	63
Figura 37. Análisis de la sobreexpresión de <i>Gankyrin</i> sobre la proliferación de las células 5637.....	64
Figura 38. Análisis del efecto de la sobreexpresión de <i>Gankyrin</i> sobre la migración de las células 5637.....	65
Figura 39. Análisis de la sobreexpresión de <i>Gankyrin</i> sobre la migración de las células 5637.....	66

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	HNF4 α	Factor nuclear 4 alfa de hepatocito
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmidico	IL-1 β	Interleucina 1 beta
AKT	Serina / treonina proteina cinasa	IL-6	Interleucina 6
ARF	Factor de ribosilación-ADP	IL-7	Interleucina 7
ARN	Ácido ribonucleico	IL-8	Interleucina 8
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	IRAK-1	Cinasas asociadas a receptores de interleucinas-1
AS	Antisentido	JAK	Cinasa Jano
ATCC	Colección americana de cultivos celulares	JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
ATG7	Proteina 7 relacionada con la autofagia	KCl	Cloruro de potasio
CDK	Cinasa dependiente de ciclina	kDa	Kilodalton
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2	KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4	LB	Luria Bertani
cDNA	Ácido ribonucleico complementario	M-MLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
CMV	Citomegalovirus	MAPK	Cinasas de proteina cinasa activadas por mitogenos
DeCS	Descriptores en ciencias de la salud	MDM2	De sus siglas en inglés "Murine double minute 2"
DMEM	Medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco	miR-605	MicroARN 605
DS	Desviación estándar	MPM	Marcador de peso molecular
E. coli	Escherichia coli	mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares	mTORC1	Complejo 1 del blanco de rapamicina en mamíferos
Fig.	Figura	Na ₂ HPO ₄	Fosfato sódico dibásico anhidro
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	NaCl	Cloruro de sodio
GFP	Proteina verde fluorescente	NCBI	De sus siglas en inglés "National Centre for Biotechnology Information"
GLOBOCAN	Observatorio global del cáncer	NF- κ B	Factor nuclear kappa B
GSK-3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta	nm	Nanometros
h Horas	h Horas	Nrf2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2
HDM2	de sus siglas en inglés "Murine double minute 2" (humano)	pb	Pares de bases
		PBS	Solución salina tamponada con fosfato
		PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
pRB	Proteína retinoblastoma
PSMD10	Subunidad no-ATPasa 10 reguladora del proteasoma 26S
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Rac1	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 asociado a Ras
RhoA	Miembro A de la familia homóloga de Ras
rpm	Revolución por minuto
RT-qPCR	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
S	Sentido
SEOM	Sociedad española de oncología médica
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
SV40	Virus símico 40
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TBST	Solución salina tamponada con Tris y Tween
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP53	Proteína de tumor 53
VPH	Virus del Papiloma humano
Wnt	Wnt de sus siglas en inglés “Wingless-related integration site”
° C	Grados Celsius
Δ CT	Diferencia en el umbral de detección (del inglés, Cycle threshold)
μ g	Microgramos
μ L	μ L

RESUMEN

El cáncer de vejiga es una de las neoplasias más frecuentes del sistema urinario. Aproximadamente el 70% de los carcinomas de vejiga son del fenotipo no músculo invasivo y se clasifican con base en el grado de diferenciación histológica y las características del tumor (TNM I a III). Recientemente, el interés por el estudio de factores predisponentes, alteraciones genéticas y características patológicas y citológicas que permitan predecir el comportamiento biológico de la enfermedad se ha incrementado; siendo igualmente importante la búsqueda de nuevos marcadores moleculares.

La sobreexpresión de *Gankyrin* ha demostrado ser un factor importante en el desarrollo de fenotipos agresivos de diversos carcinomas al estimular la tumorigénesis mediada por RAS e inducir el marcaje para degradación proteosomal de importantes supresores tumorales. Con base en la información disponible para diferentes tipos de cáncer, el presente trabajo busca evaluar los efectos de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la viabilidad, proliferación, migración e invasión de la línea celular 5637. Para ello, se diseñaron y construyeron vectores de sobreexpresión (pQBI-25 + GANK S) y de inhibición (pQBI-25 + GANK AS) de *Gankyrin* que se transfectaron en la línea celular 5637. La confirmación de la funcionalidad de los vectores se llevó a cabo con RT-qPCR y Western blot. Con respecto a la viabilidad, se observó que tanto la sobreexpresión como la inhibición de *Gankyrin* afectan de forma negativa la viabilidad en comparación con el control a las 24 horas. No obstante, el porcentaje de células viables aumentó progresivamente a las 48, 72 y 96 horas. Por su parte, las células pQBI-25 + GANK S mostraron el mayor índice de crecimiento con respecto al control, mientras que el crecimiento de las células pQBI-25 + GANK AS aumentó significativamente a las 72 y 96 horas. Finalmente, el cierre de lesión en las células pQBI-25 + GANK S fue significativamente mayor (78.79 % y 96.52 %) con respecto al control a las 24 y 48 horas respectivamente. Por el contrario, en células pQBI-25 + GANK AS se observó una disminución significativa a las 48 horas con un porcentaje de cierre del 36.61 %. En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de expresión de *Gankyrin* afectan la viabilidad, proliferación y migración de las células 5637 de carcinoma urotelial

ABSTRACT

Bladder cancer is one of the most frequent urinary system neoplasms. Approximately 70 % of bladder carcinomas represent phenotypes without histological evidence of invasion of bladder muscle tissue and they are classified based on the level of histological differentiation and the tumor characteristics (TNM I to III). Recently, the interest in the study of predisposing factors, genetic alterations, pathological and cytological characteristics that allow to predict the biological behavior of the disease has increased; being equally as important the research for new molecular markers.

Gankyrin overexpression has demonstrated to be an important factor in the development of aggressive phenotypes on diverse carcinomas by stimulating the tumorigenesis mediated by RAS and inducing the labelling of important tumor suppressors for proteasomal degradation. Based on the available information of different cancer types, the current work aims to evaluate the effects of *Gankyrin* overexpression over the viability, proliferation migration and invasion on cell line 5637. To achieve the established objectives, overexpression (pQBI-25 + GANK S) and inhibition (pQBI-25 + GANK AS) *Gankyrin* vectors were designed, constructed and finally transfected into 5637 cell line. Confirmation of vector functionality over *Gankyrin*'s expression levels was performed through RT-qPCR and Western blot. Regarding viability, it was observed that overexpression as well as inhibition of *Gankyrin* negatively affected the viability in comparison to the control at 24 hours. Nevertheless, the percentage of viable cells increased progressively at 48, 72 and 96 hours. However, pQBI-25 + GANK S cells showed the highest growth index in respect to the control, while the growth of pQBI-25 + GANK AS cells showed a significant increase in proliferation index at 72 to 96 hours. Finally, wound healing on pQBI-25 + GANK S cells was significantly higher (78.79 % and 96.52 %) compared to the control at 24 and 48 hours respectively. On the contrary, on pQBI-25 + GANK AS cells a significant decrease was visible at 48 hours with a wound healing percentage of 36.61 %. Overall, these results suggest that *Gankyrin* expression levels affect viability, proliferation and migration of urothelial carcinoma 5637 cell line.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga es la novena neoplasia más común y la décimo tercera causa de muerte más frecuente por cáncer a nivel mundial (GLOBOCAN, 2022). Siendo un tipo de cáncer que afecta tres veces más a los hombres que a las mujeres (Parkin, 2008; Antoni *et al.*, 2016). El cáncer de vejiga se caracteriza, por sus tres manifestaciones clínicas; el fenotipo no músculo invasivo (NMIBC), el no músculo inasivo de alto riesgo y el músculo invasivo (SEOM, 2020). Los fenotipos no invasivos presentan una alta tasa de progresión a estadios más avanzados del cáncer; mientras que el fenotipo músculo invasivo se caracteriza por un alto índice de recurrencia, que, en conjunto con su elevado potencial metastásico, tiende a ser mayormente letal (Mayorga *et al.*, 2014).

El diagnóstico en etapas tempranas del cáncer de vejiga representa un reto, debido a la ausencia de síntomas que sugieran en primera instancia dicha patología (DeGeorge *et al.*, 2017; Gellhaus, 2020; Kiyoshima *et al.*, 2016; Lavery *et al.*, 2017). No obstante, los métodos de diagnóstico más utilizados son la citología de la orina y la resección transuretral (SEOM, 2020). A pesar la eficiencia de estas pruebas, existen limitaciones asociadas al costo y su efectividad para el diagnóstico en estadios primarios de la enfermedad (Gellhaus, 2020).

El tratamiento para este tipo de cáncer es principalmente quirúrgico, con opción a combinaciones con esquemas terapéuticos basados en el uso de quimioterapia y/o radioterapia (SEOM, 2020). Sin embargo, a pesar de los recientes hallazgos sobre el uso de quimioterapéuticos en el tratamiento contra el cáncer, el pronóstico de supervivencia para pacientes con cáncer de vejiga es bajo; siendo en su mayoría la causa de muerte, la recurrencia y la metástasis (Galsky *et al.*, 2010; Nargund *et al.*, 2012). Es por ello, que el interés por el uso de terapias dirigidas hacia moléculas implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer, así como en el desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos que eficienten los efectos de la quimioterapia sobre las células neoplásicas, se ha incrementado.

Gankyrin, es una oncoproteína que pertenece a la clase de proteínas con repeticiones de anquirina; un motivo proteico caracterizado por poseer una secuencia larga de 33 aminoácidos dispuestos a menudo como alineamientos en tándem (DeCS, 2017). Las proteínas de esta clase se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, desempeñando funciones relacionadas con una gran variedad de procesos fisiológicos (García-Torres *et al.*, 2020) al mediar a través de sus dominios estructurales, el reconocimiento de moléculas durante las interacciones proteína-proteína (DeCS, 2017; Mosavi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). En su estado fisiológico, *Gankyrin* se encuentra como una subunidad regulatoria del proteasoma 26 S; por lo que las interacciones proteína-proteína, resultan claves en el ejercicio de su función (Zamani *et al.*, 2018). En los últimos años, se han identificado proteínas de importancia biológica como blancos de interacción con *Gankyrin*, donde destacan pRB (Higashitsuji *et al.*, 2000), CDK4 (Dawson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002), MDM2 (Higashitsuji *et al.*, 2005) y p53 (Kashyap *et al.*, 2022). Estas moléculas desempeñan funciones importantes en la progresión del ciclo celular, tumorigénesis y apoptosis (Li y Guo, 2010).

El abordaje genético clásico para la investigación de vías de importancia biológica inicia con la identificación de alteraciones causantes de un determinado fenotipo de interés, seguido por el análisis de las implicaciones funcionales del gen en una célula u organismo (Ortíz *et al.*, 2008). Resaltando, que una importante variedad de mecanismos moleculares aseguran la expresión génica en los niveles apropiados y bajo condiciones reguladas. Si bien, una expresión aumentada pudiera resultar en un fenotipo celular alterado, la disminución de los niveles de expresión asemejaría una pérdida parical o total de la función génica. Es por esto, que las estrategias paralelas de ganancia-pérdida de función representan un abordaje prometedor para el estudio de genes asociados al cáncer, proporcionando una herramienta útil para el entendimiento funcional de moléculas que permanecen desconocidas o poco esclarecidas (Ortíz *et al.*, 2008; Prelich, 2012).

Como parte de estas estrategias, el uso de vectores ha facilitado el avistamiento y la elucidación de mecanismos implicados en la tumorigénesis y la resistencia quimioterapéutica en distintos tipos de cáncer (Song *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2023). Li *et*

al., (2005) reportaron que la inhibición de *Gankyrin* induce la regresión tumoral y la muerte por apoptosis en células de cáncer hepático. Por su parte, Wang *et al.*, (2020) reportaron que la sobreexpresión de *Gankyrin* en líneas celulares de carcinoma renal, resultó en el incremento de la proliferación, migración, invasión y tumorigenicidad; mientras que su silenciamiento, resultó en la apoptosis celular.

En el cáncer de vejiga, las implicaciones funcionales de *Gankyrin*, así como sus interacciones funcionales, no han sido reportadas. Debido a esto, el presente trabajo tiene como propósito evaluar los efectos de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la línea celular 5637 (HTB-9) de cáncer de vejiga.

ANTECEDENTES

1. Bases del cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga se posiciona como la novena neoplasia más común y la décimo tercera causa de muerte más frecuente por cáncer a nivel mundial. Esta enfermedad puede ser causada por una gran variedad de factores, donde destacan, en primer lugar el tabaquismo; seguido por factores ambientales, la exposición ocupacional a aminas aromáticas, hidrocarburos y otras sustancias químicas empleadas en la industria de metales, tintes, gomas y petróleo; el consumo de algunos fármacos y otros factores biológicos (SEOM, 2020).

2. Epidemiología del cáncer de vejiga

De acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer, el total de casos nuevos de cáncer, reportados a nivel mundial en 2022 fue de 19,976,499 con 9,743,832 defunciones (GLOBOCAN, 2022). En el mismo año, el total de casos nuevos reportados de cáncer de vejiga a nivel mundial fue de 614,298 con 220,586 defunciones reportadas (GLOBOCAN, 2022). Estas estadísticas posicionan al cáncer de vejiga en el noveno lugar en incidencia y en el décimo tercer lugar en mortalidad a nivel mundial.

En México, las estadísticas del GLOBOCAN colocan a este tipo de cáncer en el 15° lugar de incidencia con 3,814 casos nuevos y representa la décimo quinta causa de muerte más frecuente por cáncer con 1,404 decesos (GLOBOCAN, 2022). Este tipo de cáncer tiene una mayor prevalencia en personas mayores de 55 años (SEOM, 2020; DeGeorge *et al.*, 2017). Siendo el tabaquismo y la exposición ocupacional a aminas, hidrocarburos y a otras sustancias químicas empleadas en la industria de metales, tintes, gomas y petróleo los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de vejiga (Mayorga *et al.*, 2014; Sanli *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2020). Aunado a estos, existen otros factores predisponentes para el desarrollo del cáncer de vejiga, como lo son, el consumo prolongado de algunos fármacos, la exposición a radiación ionizante, factores

ambientales, infecciones con serotipos de VPH de alto riesgo y el ser portador del parásito causante de la enfermedad de esquistosomiasis (Mayorga *et al.*, 2014; Al-Zalabanni *et al.*, 2016; Fankhauser y Mostafid, 2018; SEOM, 2020).

El cáncer de vejiga se origina cuando las células que comprenden el revestimiento de la vejiga, compuesto en su mayoría por células uroteliales, comienzan a proliferar de forma descontrolada y forman un tumor (Sanli *et al.*, 2017; SEOM, 2020). La clasificación del cáncer de vejiga depende de las características histomorfológicas de las células al observarse bajo el microscopio (SEOM, 2020); siendo el tipo más frecuente el carcinoma urotelial (90 % de los casos). No obstante, además de la clasificación por origen celular, el cáncer de vejiga se clasifica como no invasivo, no músculo invasivo de alto riesgo y músculo invasivo (Hall *et al.*, 2007; Aldousari y Kassouf, 2010; SEOM, 2020).

3. Tratamiento del cáncer de vejiga

El tratamiento del cáncer de vejiga es principalmente quirúrgico, mediante la práctica de la resección transuretral y dependiendo de la clasificación TNM (Tumor, Nódulo y Metástasis) que contempla el tamaño tumoral y el grado de extensión / diseminación, se realiza una cistectomía parcial o radical (American Cancer Society, 2021).

Dentro de los tratamientos terapéuticos disponibles para los tipos de cáncer no invasivo y no músculo invasivo se encuentra la resección transuretral, complementada con una dosis única de inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o con esquemas quimioterapéuticos basados en el uso de mitomicina C, epirubicina y doxorubicina (Hall *et al.*, 2007; American Cancer Society, 2021). Teniendo los pacientes, una tasa de supervivencia a 5 años del 80 % (Mayorga *et al.*, 2014). No obstante, pese a que un alto porcentaje de los pacientes, muestran una respuesta inicial favorable, esta rara vez es duradera, con un índice de recurrencia de entre el 50 % al 80 %, aunado a un riesgo de progresión a 5 años del 10 % al 25 % (Hall *et al.*, 2007; Mayorga *et al.*, 2014).

Por su parte, la cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral y quimioterapia basada en el uso de cisplatino, es ampliamente recomendada en pacientes diagnosticados con la forma músculo invasiva y en aquellos cuya enfermedad se ha diseminado a los ganglios linfáticos (Hall *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2013). Sin embargo, cerca del 50 % desarrollan metástasis en los primeros 2 años años (Mayorga *et al.*, 2014), siendo el principal tratamiento, el uso de gemcitabina metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino (DeGeorge *et al.*, 2017). La tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con fenotipo invasivo es del 20 % al 55 % dependiendo del estadio, mientras que la tasa de supervivencia para la enfermedad metastásica es menor al 5 % (Mayorga *et al.*, 2014).

Actualmente, los estudios de las ciencias ómicas han permitido la identificación de alteraciones en genes implicados en múltiples procesos celulares, tales como en las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, PTEN, MAPK/ERK, JAK-STAT y p53/pRB, importantes en la tumorigénesis, ciclo celular y muerte. Alteraciones en estas vías han sido asociadas frecuentemente a un peor pronóstico; constituyendo así posibles abordajes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de vejiga.

4. Gankyrin

Gankyrin, también referido como *PSMD10/P28* es un oncogén ubicado en el cromosoma Xq22.2 cuya sobreexpresión, inicialmente identificada en carcinoma hepatocelular (Higashitsuji *et al.*, 2000; Higashitsuji *et al.*, 2005) ha sido reportada en una gran variedad de cánceres humanos humanos (Li *et al.*, 2018; Zhen *et al.*, 2013; Man *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2020). A nivel proteico, *Gankyrin* es una proteína de 25 kDa compuesta por siete repeticiones de anquirina; un motivo proteico constituido por una secuencia larga de 33 aminoácidos a menudo dispuesta en tándem (DeCS, 2017). Las proteínas de esta clase están ampliamente distribuidas en la naturaleza, ejerciendo funciones en una gran variedad de procesos fisiológicos (García-Torres *et al.*, 2020) al mediar a través de sus dominios estructurales, el reconocimiento de moléculas durante las interacciones proteína-proteína (DeCS, 2017; Mosavi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

En estado fisiológico, *Gankyrin* ha sido descrito como una subunidad reguladora del proteasoma 26S, por lo que las interacciones proteína-proteína resultan clave para ejercer su función (String, 2022). Independientemente del proteasoma, *Gankyrin* tiene el potencial de interacción con diversas proteínas de importancia biológica (Tabla 1.), regulando sus funciones y con ello, múltiples vías de señalización (Man *et al.*, 2010) implicadas en la progresión del ciclo celular, tumorigénesis y apoptosis (Li y Guo, 2010; Kanabar y Muth, 2020).

Por su parte, la sobreexpresión de *Gankyrin* ha demostrado su potencial oncogénico como potenciador de procesos de marcaje y degradación proteosomal de importantes complejos moduladores de la progresión del ciclo celular, proliferación, transición epitelio-mesenquimal, invasividad, metástasis y quimioresistencia (Camacho Moll *et al.*, 2019; Kanabar y Muth, 2020). Específicamente, al promover la tumorigénesis mediada por RAS (Man *et al.*, 2010) y fungir como regulador de las vías de supresión tumoral *JNK*, *PI3K/AKT*, *mTOR*, *CDK/pRB* y *HDM2/P53* (Krzywda *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2006). Diversos estudios han evidenciado que *Gankyrin* activa a la proteína ubiquitina-ligasa MDM2 derivando en la degradación proteosomal de p53 (Higashitsuji *et al.*, 2005; Brooks y Gu, 2006), teniendo como consecuencia la represión de genes apoptóticos inducidos por la actividad transcripcional de p53 (Hanahan y Weinberg, 2000). Asimismo, aumentos en la expresión de *Gankyrin* incrementan la fosforilación e inactivación de la proteína retinoblastoma, provocando la desestabilización del complejo RB/P53 y promoviendo la transformación celular (Higashitsuji *et al.*, 2000; Iwai *et al.*, 2003). Por ello su importancia en el desarrollo de fenotipos agresivos de diversos carcinomas.

En carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión de *Gankyrin* ha sido asociada al proceso de carcinogénesis (Fu *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2014), demostrando también que esta proteína induce el crecimiento y potencial tumoral de células NIH/3T3 (Higashitsuji *et al.*, 2000;). Wang *et al.*, (2008) reportaron que la sobreexpresión de *Gankyrin* promovió la proliferación de células Huh-7 aunado al aumento en la expresión de la proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-5). Por el contrario, la disminución en los niveles de expresión de *Gankyrin* en la línea celular NTERA2 de

carcinoma de testículo (TGCC), resultó en un incremento de la sensibilidad a cisplatino y apoptosis mediada por TP53 (Camacho-Moll *et al.*, 2019). Además de los ya mencionados, se ha reportado la identificación de *Gankyrin* en cánceres de diversas etiologías, como lo son: el cáncer oral, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, entre otros (Dawson *et al.*, 2002; Krzywda *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Kashyap *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021), donde se correlacionan los niveles de expresión de *Gankyrin* con la progresión tumoral, el pronóstico y el potencial metastásico (Nagao *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2014).

En cáncer de vejiga, las implicaciones funcionales de *Gankyrin* no han sido esclarecidas. No obstante, su expresión es detectable. Entre las alteraciones genéticas relacionadas con la hiperplasia y tumor de vejiga están el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), los genes P53 y Rb, la pérdida de CDKN2A (Shin *et al.*, 2018), entre otras (Battista *et al.*, 2012; Sanli *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018). Mismas, que han sido reportadas como alteradas por la expresión de *Gankyrin* en otros tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2021).

Tabla 1. Regulación de vías de señalización mediada por *Gankyrin* en cánceres humanos.

Moléculas y vías de señalización	Fenotipo afectado por interacción con Gankyrin	Referencias
STAT3/AKT, HNF4 α , ATG7, Nrf2	Ciclo celular, proliferación, metástasis, potencial de renovación de células troncales, autofagia.	(Fu <i>et al.</i> , 2002; Fu <i>et al.</i> , 2011; Jing <i>et al.</i> , 2014).
PI3K/AKT, IL-6/STAT3, TGF β /SMAD3, miR-605	Proliferación, metástasis, transición epitelio-mesenquimal.	(Man <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017).
Ciclina D1, ciclina E, PI3K/AKT	Crecimiento celular, motilidad celular, invasividad y metástasis.	(Zheng <i>et al.</i> , 2014; Liu <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2009; Zeng <i>et al.</i> , 2017).
IL-8, ciclina D1, mTORC1, PI3K/GSK-3 β / β -catenina, TNF- α , IL-7, STAT3	Proliferación y metástasis.	(Tang <i>et al.</i> , 2010; Wu <i>et al.</i> , 2015; Qin <i>et al.</i> , 2016; He <i>et al.</i> , 2016).
Ciclina A, ciclina D1, ciclina E, CDK2, CDK4, PCNA, Rb, P27, P53	Crecimiento celular, proliferación, ciclo celular.	(Meng <i>et al.</i> , 2010).
P53, P21, AKT/mTOR	Proliferación, migración y tumorigénesis.	(Hwang <i>et al.</i> , 2014).
Vimentina, β -catenina, Twist2, E-cadherina	Tumorigénesis, metástasis, transición epitelio-mesenquimal.	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
Rac1, E-cadherina	Tumorigénesis, invasividad y metástasis.	(Zhen <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2013; Gao <i>et al.</i> , 2014).
ARF/MDM2-P53	Ciclo celular, apoptosis, reparación del daño al ADN, senescencia.	(Higashitsuji <i>et al.</i> , 2005)
Rel/NF- κ B	Transcripción del ADN, proliferación, producción de citocinas, supervivencia celular y apoptosis.	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
Wnt/ β -catenina	Supervivencia celular, proliferación, homeostasis, tumorigénesis, organización del citoesqueleto celular.	(Dong <i>et al.</i> , 2011)
IL-1 β /IRAK-1	Activación de NF- κ B.	(Su <i>et al.</i> , 2015)
RhoA/ROCK/PTEN	Proliferación celular.	(Man, <i>et al.</i> , 2010).

Elaborada con información obtenida de Zamani *et al.*, (2017) y Li *et al.*, (2018).

5. Transfección de la línea celular 5637

La línea 5637 es una línea celular aislada a partir del urotelio de un paciente caucásico de 68 años de edad diagnosticado con carcinoma de células transicionales grado II. Recientemente, las terapias basadas en ácidos nucleicos han provisto de estrategias prometedoras tanto para la inducción, como para la represión de la expresión de un gen de interés.

Con el propósito de ingresar material genético exógeno a una célula, constantemente se han desarrollado y optimizado diversos vectores plasmídicos que permiten la inserción y propagación de una secuencia génica específica en un sistema biológico de elección para

el estudio (NIH, 2023). La transfección celular no viral posee una alta eficiencia de transfección y una baja toxicidad (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008). Por su parte, la lipofectamina, un agente químico derivado de lípidos cationizados de colesterol, diacilglicerol y poliaminas, permite la interacción con el grupo fosfato del ADN a través de las cargas positivas de los lípidos; derivando en la formación de complejos de transfección que, al interactuar con la membrana celular negativamente cargada, permite su paso al citoplasma celular por endocitosis (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008). Adicionalmente, el uso de un gen reportero como la proteína verde fluorescente (GFP) permite la identificación mediante microscopía de las células transfectadas; así como la estimación relativa de los niveles de expresión de la proteína, y su ubicación subcelular (Kinoshita *et al.*, 2008).

El vector pQBI-25 (Fig. 1) además de contar en su estructura con un origen de replicación, un sitio múltiple de clonación y una región promotora (Kinoshita *et al.*, 2008) consta de dos casetes de expresión dirigidos por los promotores constitutivos CMV y SV40. El promotor CMV de citomegalovirus controla la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) y es uno de los principales promotores virales empleados en los sistemas de expresión eucariota (Kinoshita *et al.*, 2008) mientras que el promotor SV40 es responsable de la expresión de la neomicina fosfotransferasa II (Condreay *et al.*, 1999). En conjunto estos elementos favorecen una alta eficiencia de transfección (Kinoshita *et al.*, 2008).

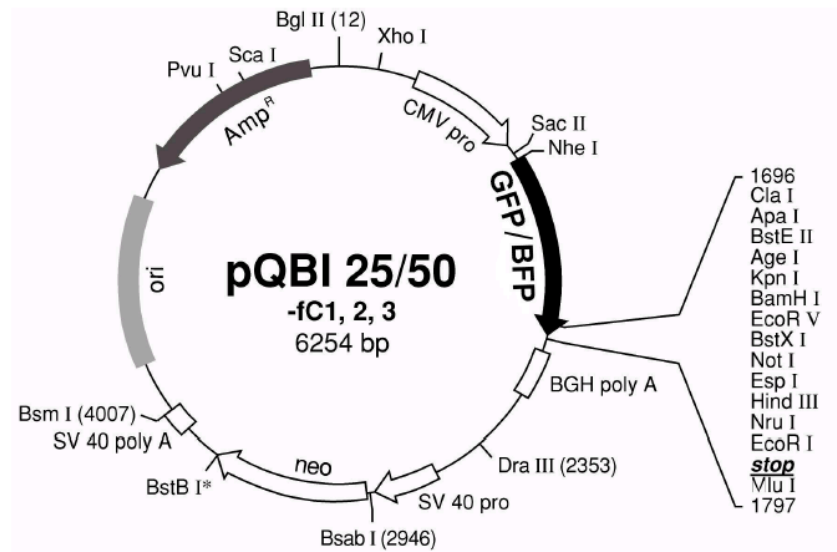


Figura 1. Imagen representativa del vector pQBI-25. Se muestra el tamaño (6,254 pb) y la estructura del vector pQBI-25 conteniendo el sitio de origen de replicación, un promotor constitutivo CMV que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) o de secuencias de inserción con sitios de restricción para las enzimas NheI y SacII, un sitio múltiple de clonación para la generación de proteínas de fusión con GFP y la presencia de genes de resistencia a ampicilina y neomicina.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la patogénesis del cáncer de vejiga permanece sin esclarecerse. Se ha demostrado que tanto la inactivación de genes supresores de tumor, como la activación de oncogenes están relacionadas con el desarrollo del cáncer de vejiga. Por lo que diversos biomarcadores han sido utilizados para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad, destacando el antígeno de tumor proteína de matriz nuclear 22 (NPM22) y el producto de la degradación de la fibrina en la orina (FDP) (Ng *et al.*, 2021). Estos biomarcadores presentan limitaciones y no son lo suficientemente efectivos para reemplazar a la cistoscopia como “*gold estándar*” en el diagnóstico confirmatorio del cáncer de vejiga. Por lo que resulta indispensable el hallazgo de nuevos y efectivos biomarcadores que asistan al diagnóstico temprano, aunado a la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis del cáncer de vejiga.

Estudios basados en la sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin*, han revelado de forma directa e indirecta los mecanismos implicados en la tumorigénesis y resistencia quimioterapéutica en distintos tipos de cáncer (Song *et al.*, 2013; Camacho-Moll *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2023). Es por ello, que el presente trabajo busca evaluar los efectos de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la viabilidad, proliferación, migración e invasión en un modelo celular de cáncer de vejiga. Ampliando el panorama de entendimiento y evidencia sobre *Gankyrin* como un posible blanco para el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer de vejiga.

HIPÓTESIS

La sobreexpresión del oncogén *Gankyrin* afecta la viabilidad, proliferación, migración e invasión de la línea celular 5637 de cáncer de vejiga.

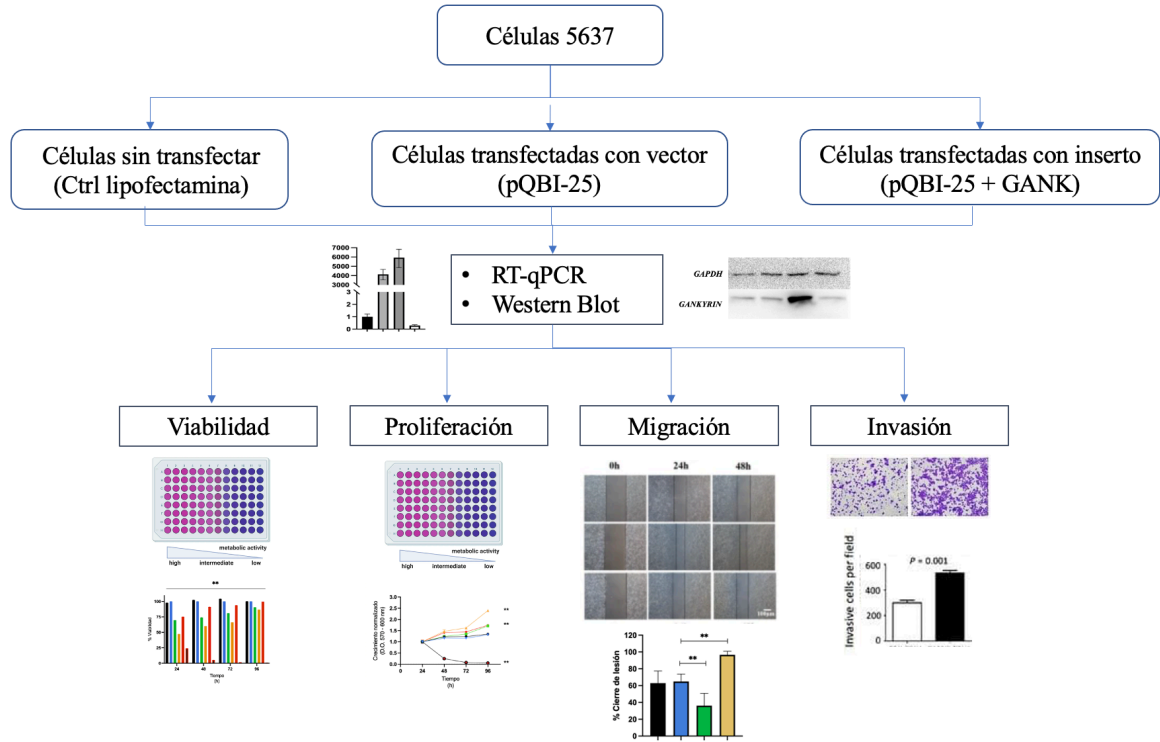
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la sobreexpresión del oncogén *Gankyrin* sobre la viabilidad, proliferación, migración e invasión de la línea celular 5637 de cáncer de vejiga.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la expresión ectópica del gen *Gankyrin* en un modelo celular de cáncer de vejiga mediante un vector de sobreexpresión.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la viabilidad, proliferación, migración e invasión de la línea celular 5637.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular 5637 (HTB-9) proveniente de un paciente caucásico de 67 años de edad, con diagnóstico de carcinoma de células transicionales grado II se adquirió de la ATCC (American Type Culture Collection, VA, EUA). El cultivo celular se realizó en medio DMEM (Gibco, cat. 11965092, CA, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, cat. 26140079), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, cat. 11140050), 1% de piruvato (Corning, cat. 15323581, NY, EUA) y 1% antibiótico antimicótico (Gibco, cat. 15240112) en condiciones de cultivo a 37 °C, 5% CO₂ y 99% de humedad relativa (HR). Todos los pases se realizaron al alcanzar confluencias del 80%.

PCR punto final

La extracción del ácido ribonucleico (ARN) total se realizó con el reactivo TRIzol® (Invitrogen, cat. 15596026, MA, EUA) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La pastilla de ARN se solubilizó en agua libre de nucleasas. La síntesis de cDNA se realizó con la enzima retrotranscriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor. Posteriormente el cDNA sintetizado se utilizó en una reacción en cadena de la polimerasa con un par de cebadores dirigidos hacia los genes *Gankyrin* y *GAPDH* en un volumen final de reacción de 20 µL. Los parámetros empleados fueron 30 ciclos compuestos por: 2 minutos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, 30 segundos a 72 °C y 3 minutos de extensión final a 72 °C en el termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems, MA, EUA). Las secuencias de los cebadores se enlistan a continuación:

Cebadores para *Gankyrin*:

5'- TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' (forward)

5'- TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT -3' (reverse)

Cebadores para *GAPDH*:

5'- ATGAGGCTACAGCAATGCAC -3' (forward)

5'- TACTTGCTCCTTGGGACACC -3' (reverse)

RT-qPCR

La cuantificación en tiempo real se realizó en condiciones estándar, empleando una mezcla compuesta de SYBR-green® (Bioline, Meridian biosciences, CIN, EUA), los pares de cebadores dirigidos a los genes *Gankyrin* y *GAPDH* descritos anteriormente, cDNA y agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 µL. Los parámetros empleados fueron: 50 ciclos compuestos por las fases de activación de la polimerasa a 95 °C durante 2 minutos, fase de desnaturalización a 95 °C por 5 segundos, fase de alineamiento a 60 °C por 10 segundos y una extensión final a 72 °C durante 20 segundos en el termociclador 7500 Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems). Cada grupo se analizó por triplicado y se utilizó como control de normalización el gen *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa). El análisis de los datos se realizó con el QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.2 (Applied Biosystems) y se procesaron de acuerdo con el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001) para el análisis de la expresión relativa de los genes por qPCR.

Subclonación en *E. coli DH5a* competentes

El producto de PCR específico de *Gankyrin* fue subclonado en el vector pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen, cat. 450641) y propagado en células *E. coli DH5a*. El cultivo fue inoculado en medio LB (Condalab, cat. 1551.00, Mad., ESP) y agar LB (Condalab, cat. 1083.00) adicionado con kanamicina 50 µg/mL o ampicilina 50 µg/mL (Sigma Aldrich, MO, EUA) para la subclonación en el vector pQBI-25 (Qbiogene, Chennai, IND) empleando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, cat. M0202, MA, EUA) siguiendo las especificaciones del proveedor.

Transfección de cultivo celular

La secuencia de *Gankyrin* se amplificó y subclonó en el vector pQBI-25. Una vez generada la construcción pQBI-25 + GANK, se realizó la siembra de 1,500,000 células por pozo en placa de 6 pozos para garantizar una confluencia del 80 – 90 % al día de la transfección. La construcción pQBI-25 + GANK y el vector sin inserto fueron transfectados en la línea celular 5637 empleando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen, cat. 11668-019) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La estabilización de los complejos ADN-lípidos catiónicos se llevó a cabo en medio Optimem (Gibco, cat. 31985070). En todos los ensayos se incluyó un cultivo sin transfectar como control de lipofección. Los cultivos se mantuvieron en privación de 4 a 5 horas cuando se realizó el reemplazo del medio a DMEM completo. Transcurridas 24 horas post-transfección, se evaluó la eficiencia de transfección por microscopia confocal en el EVOS™ (Invitrogen EVOS™ FL Digital Inverted Fluorescence Microscope cat. 12-563-460). Así como la extracción de RNA y proteínas.

Extracción de proteínas y Western Blot

La extracción de proteínas se realizó con buffer Pierce™ RIPA (ThermoFisher, cat. 89901, MA, EUA). La placa de cultivo se lavó con PBS 1X (8 g NaCl + 0.2 g KCl + 1.44 g Na₂HPO₄ + 0.24 g KH₂PO₄, pH 7.4) y las células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se removió el PBS y se agregó inhibidor de proteasa (ThermoFisher, cat. A32955). El producto fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford, empleando como estándar de 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (ThermoFisher, cat. 23209) y se leyó la absorbancia a 600 nm. De las muestras obtenidas se realizó una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10 % (Bio-Rad, cat. 161-0154, CA, EUA) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) a 75V por 25 minutos y a 120V durante 50 minutos empleando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó en membrana PVDF empleando la Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)

a 15 V durante 2 horas. El bloqueo se realizó con 5 % de leche descremada (Svelty®) en buffer TBS 1X (Tris Base + NaCl, pH 7.6) durante 1 hora en agitación constante a 300 rpm y se lavó la membrana con TBST (TBS + Tween 20). Las membranas se dejaron en incubación con los anticuerpos primarios (anti-Gankyrin, Novus Biologicals, cat. NBP1-82443, CO, EUA; anti-GAPDH, Cell Signaling Technology, cat. 97166S, MA, EUA) durante toda la noche a 4 °C y 300 rpm. Los lavados se realizaron con TBST 1X a 300 rpm por 5, 10 y 15 minutos respectivamente. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante a 300 rpm seguido de lavados con TBST. La membrana se transfirió a un acetato y se agregó la solución reveladora, incubando la reacción por 1 minuto. Finalmente, se detectó la quimioluminiscencia por medio del ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad).

Ensayo de viabilidad

Se sembraron 8,000 células transfectadas con pQBI25 + GANK o el vector vacío en placas de 96 pozos para cada uno de los períodos a evaluar: 24, 48, 72 y 96 horas y se incubaron durante 24 h en medio DMEM completo. Transcurridas 24 h se realizó un lavado con buffer de fosfato salino (PBS) y se añadió medio fresco a todos los pozos. El control positivo se trató con mitomicina C (Cayman Chemical Co., cat. 11435, MI, EUA) a una concentración de 10 µg/mL. De acuerdo con el tiempo de medición, el medio DMEM se sustituyó con medio adicionado con azul de alamarTM HS (Invitrogen, cat. A50100) y se incubaron las células por 1 hora 30 minutos en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a 570 y 600 nm. Los datos registrados de las absorbancias fueron procesados con la fórmula $[(O2 \times A1) - (O1 \times A2)] / [(O2 \times P1) - (O1 \times P2)] \times 100$ para el cálculo de la viabilidad celular, considerando como 100 % a las células transfectadas con el vector pQBI-25 sin inserto.

Ensayo de proliferación

El cálculo del crecimiento celular normalizado se realizó mediante un ensayo con azul de alamarTM HS. Las células transfectadas se sembraron en placas de 96 pozos y se incubaron

durante 24, 48, 72 y 96 horas. Posterior a los tiempos de incubación, las células fueron tratadas con azul de alamarTM HS e incubadas durante 1 hora y media a 37 °C en oscuridad. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 570 y 600 nm.

Ensayo de cierre de herida

La motilidad de las células se determinó mediante el ensayo de lesión en monocapa. Se sembraron células transfectadas con pQBI25 + GANK o el vector vacío en placas de 6 pozos a una densidad de 1×10^6 células / pozo y se incubaron durante 24 h en medio DMEM completo. Transcurrido el tiempo, se realizó la lesión en cada uno de los pozos empleando puntas de pipeta estériles y se substituyó el medio DMEM por medio de privación sin suero fetal. La toma de fotografías se realizó a las 0, 24 y 48 horas en condiciones de privación.

Ensayo Transwell

La invasión celular se determinó mediante el ensayo de transwell. La cámara superior se recubrió con Matrigel (Corning, NY, EUA) en dilución 1:6. Un total de 2×10^5 células transfectadas con pQBI25 + GANK o el vector vacío se resuspendieron en medio DMEM suplementado y se añadieron a la cámara superior. La cámara inferior fue adicionada con 500 μ L de medio DMEM completo. Posterior a las 24 h de incubación a 37 °C, se removió el medio y se lavaron las cámaras por duplicado con buffer de fosfato salino (PBS). Las células en la cámara inferior se fijaron con formaldehído, se tiñieron con 0.5 % de solución cristal violeta y se realizó el conteo de 5 áreas seleccionadas al azar.

Análisis estadístico

Para los análisis de viabilidad, proliferación, migración e invasión se realizó la prueba de ANOVA de dos vías en el software GraphPad Prism 8.02 (GraphPad Software, Inc. CA, EUA).

RESULTADOS

Con la finalidad de subclonar el fragmento específico de *Gankyrin*, se realizó una PCR punto final dirigida al gen *Gankyrin*, utilizando como templado cDNA obtenido de la línea celular HepG2 y la mezcla de reactivos para PCR descrita en la sección de material y métodos. En el ensayo se incluyó un control negativo (sin templado). Los productos fueron sometidos a separación electroforética en gel de agarosa 1 % y teñido con GelRed® (Fig. 2), donde se observó la amplificación de un fragmento específico de 681 pares de bases, el cual coincide con el peso esperado de *Gankyrin*.

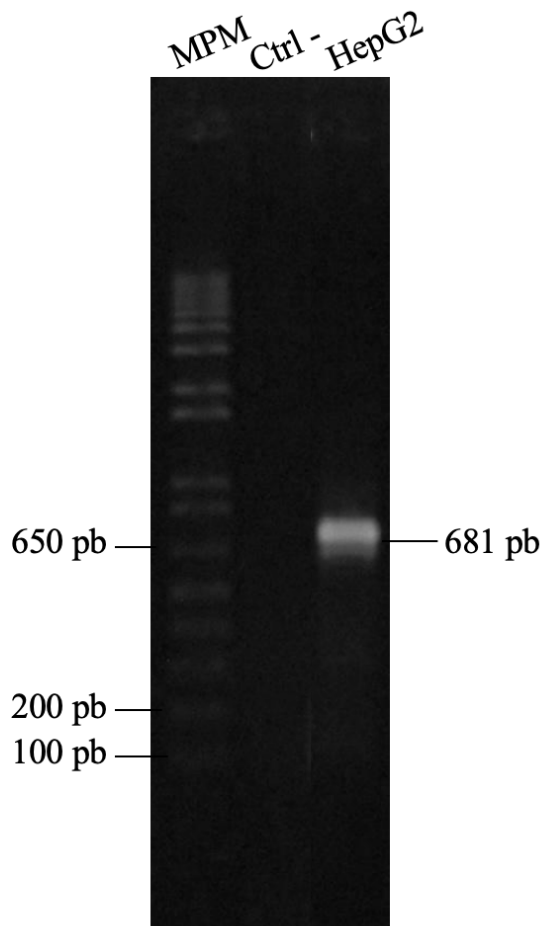


Figura 2. Amplificación del fragmento específico del gen *Gankyrin*. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases. Se observa la amplificación del fragmento específico de 681 pb a partir de cDNA proveniente de la línea celular HepG2.

Posteriormente, el producto de PCR fue empleado en una reacción de subclonación en el vector pCRTM2.1-TOPO (Fig. 3) y transformado en células *E. coli* DH5a competentes.

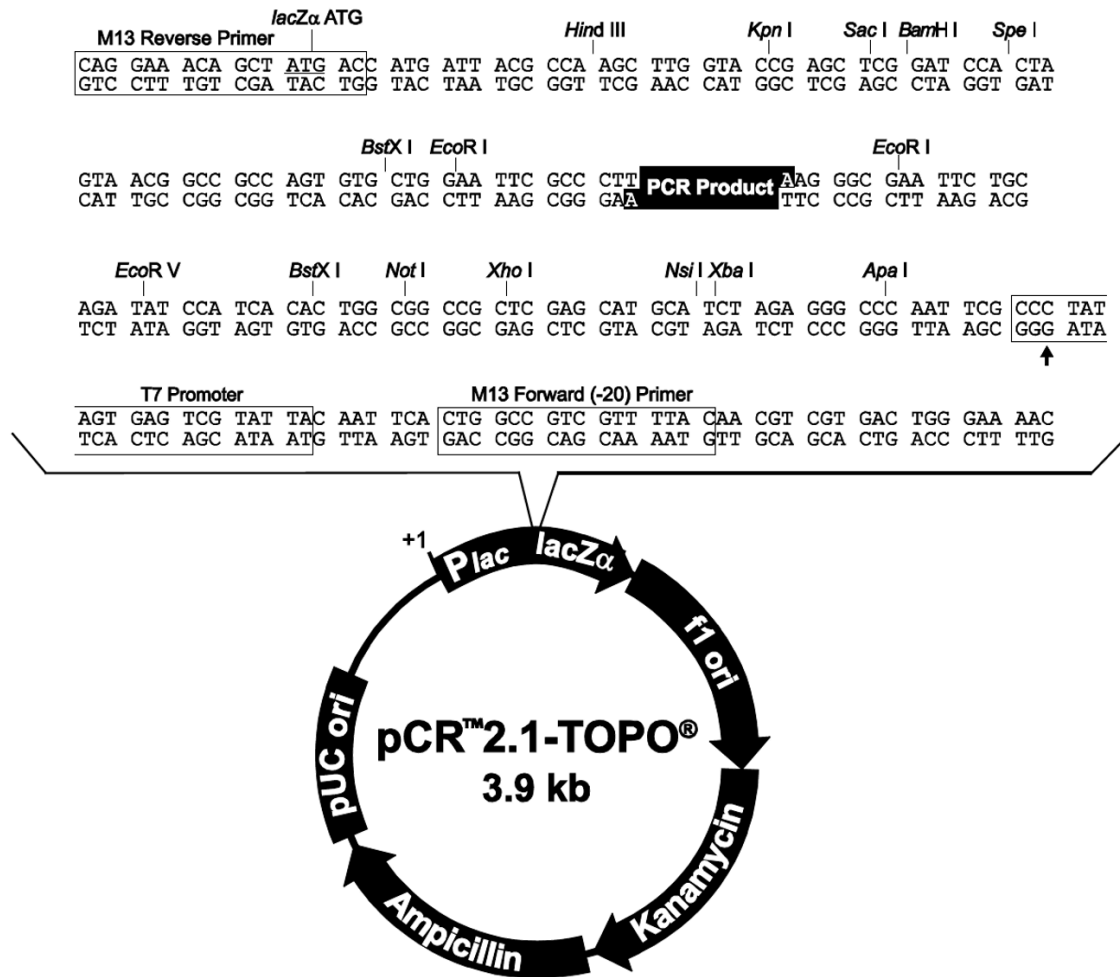


Figura 3. Imagen representativa del vector pCRTM2.1-TOPO. Se muestran las características, la secuencia flanqueante del sitio múltiple de clonación (bases 234 - 357) y los sitios de restricción contenidos en el vector. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción para la polimerasa T7 (bases 364 – 383). Además, se ilustran el sitio de origen de replicación pUC (bases 3136 - 3809) y el gen de resistencia a kanamicina (bases 1319 – 2113).

Una vez obtenidas las colonias transformadas, se realizó la identificación de los posibles candidatos mediante PCR de colonias, donde se observó la amplificación del fragmento de 681 pb correspondiente a *Gankyrin*, en dos de los candidatos analizados (Fig. 4).

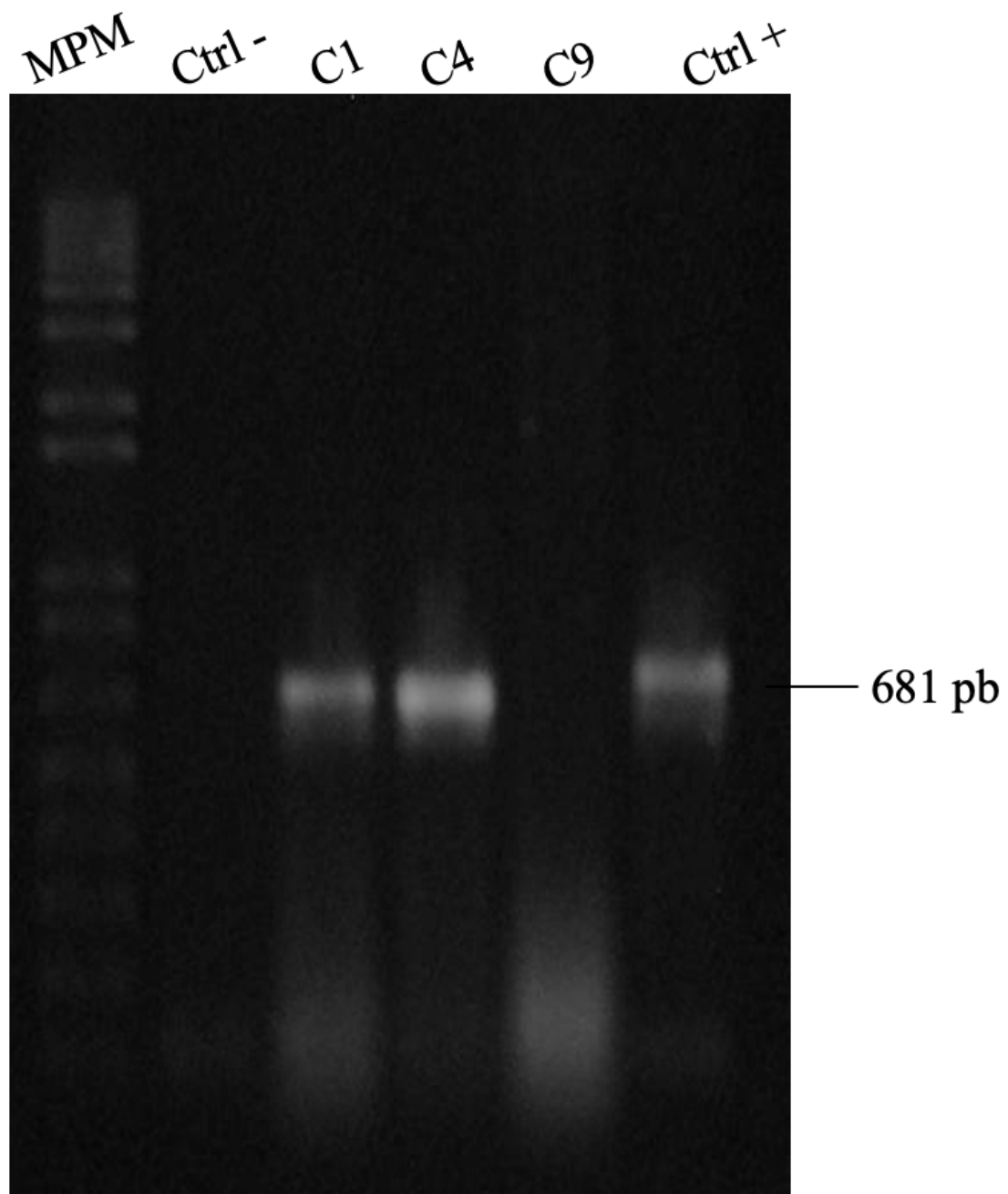


Figura 4. Identificación de candidatos por PCR de colonias. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de PCR de los posibles candidatos portadores del gen de interés. Se observan fragmentos de 681 pb correspondientes a *Gankyrin* en los candidatos 1 y 4.

Una vez identificados los candidatos positivos para la construcción pCR2.1TOPO + GANK, se realizó el aislamiento y propagación del candidato 1. Transcurridas 24 horas de la inoculación en medio LB adicionado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina se realizó la purificación del ADN plasmídico (ADNp) a partir del candidato transformado con la construcción pCR2.1TOPO + GANK mediante lisis alcalina (Fig. 5); observándose un máximo pico de absorbancia a los 260 nm.

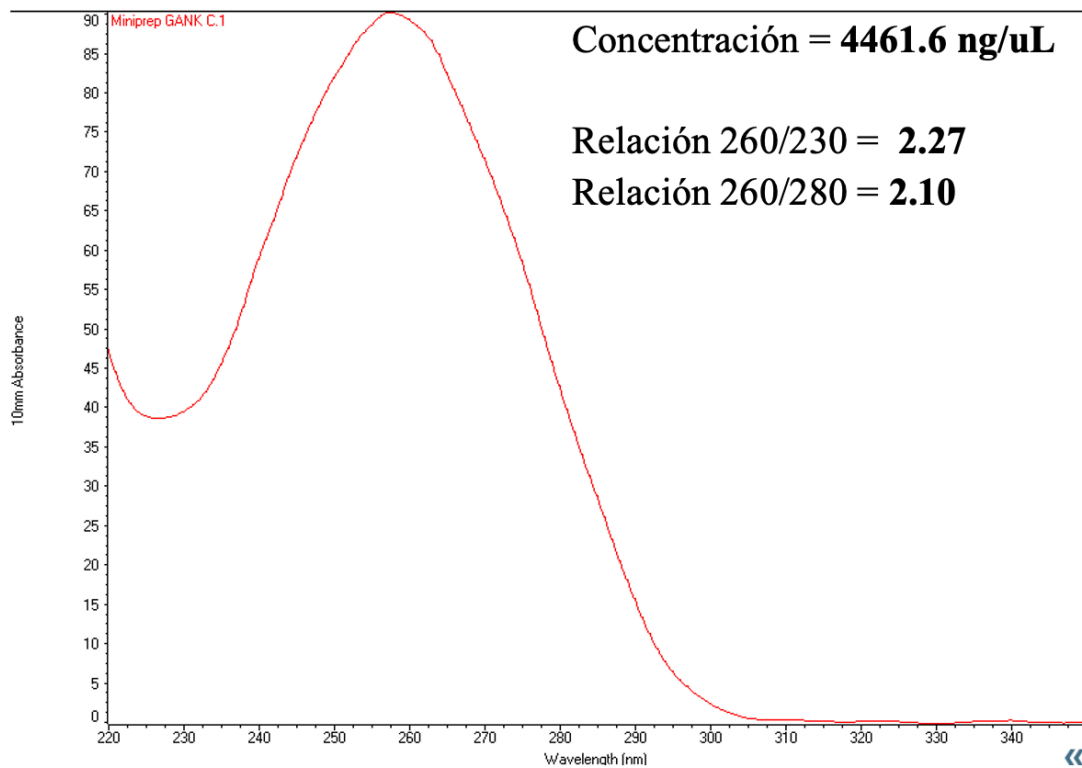


Figura 5. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp del vector pCR2.1TOPO + GANK. El ADNp del candidato 1 purificado mediante lisis alcalina mostró una concentración de 4,461.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 de 2.27 y 2.10 respectivamente.

Adicionalmente, se realizó el análisis de la integridad del ADNp purificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, donde se observó una banda correspondiente al tamaño de la construcción (Fig. 6).

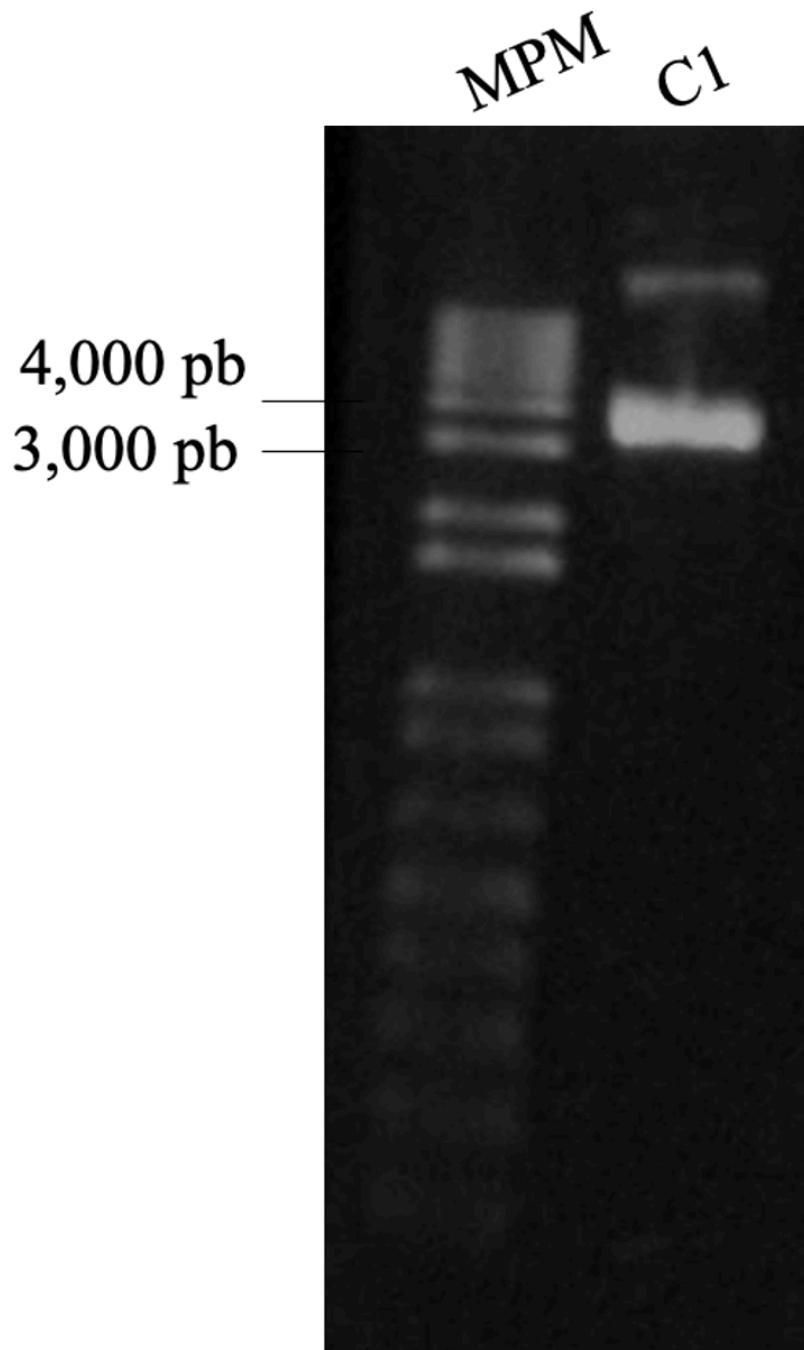


Figura 6. Análisis de integridad del ADN del vector pCR2.1TOPO + GANK. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad del ADN plasmídico purificado mediante lisis alcalina a partir del candidato 1 transformado con la construcción pCR2.1TOPO + GANK.

Posterior a la purificación y con el objetivo de caracterizar la construcción pCR2.1TOPO + GANK, el ADN plasmídico se sometió a digestión enzimática con la enzima NheI. Como control negativo de la reacción se utilizó ADNp sin exposición a la enzima. La reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (Fig. 7). El corrimiento electroforético mostró un fragmento de 681 pb que correspondió con el tamaño de *Gankyrin*, confirmando la presencia del inserto en el vector.

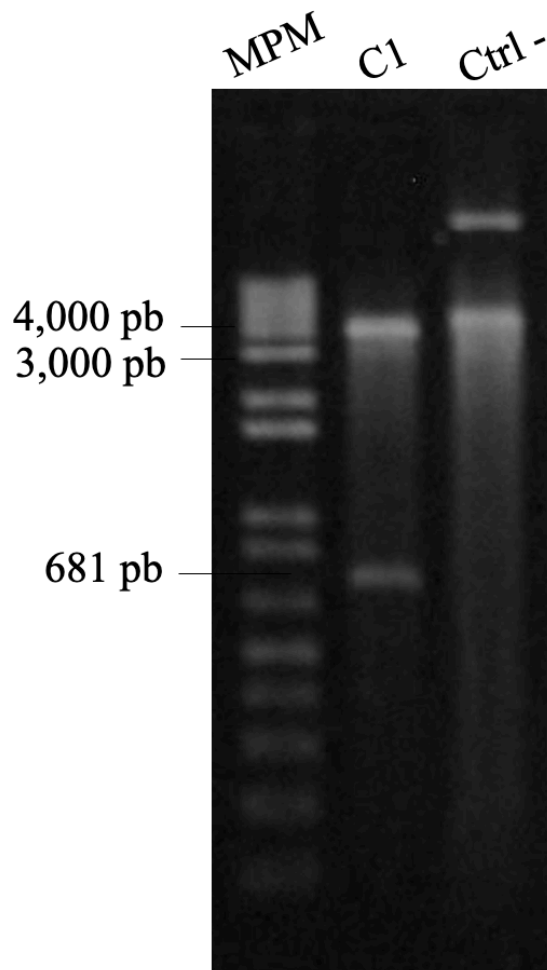


Figura 7. Caracterización enzimática de la construcción pCR2.1TOPO + GANK con NheI. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n); Ctrl (-). - Control negativo. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la digestión enzimática del vector pCR2.1TOPO + GANK con la enzima NheI. El control negativo se sometió a las mismas condiciones en ausencia de enzima.

Con base en los resultados de la caracterización enzimática y con la finalidad de evaluar la fidelidad de la secuencia del inserto por secuenciación, se procedió a cuantificar y determinar la pureza del ADNp del vector pCR2.1TOPO + GANK mediante espectrofotometría (Fig. 8).

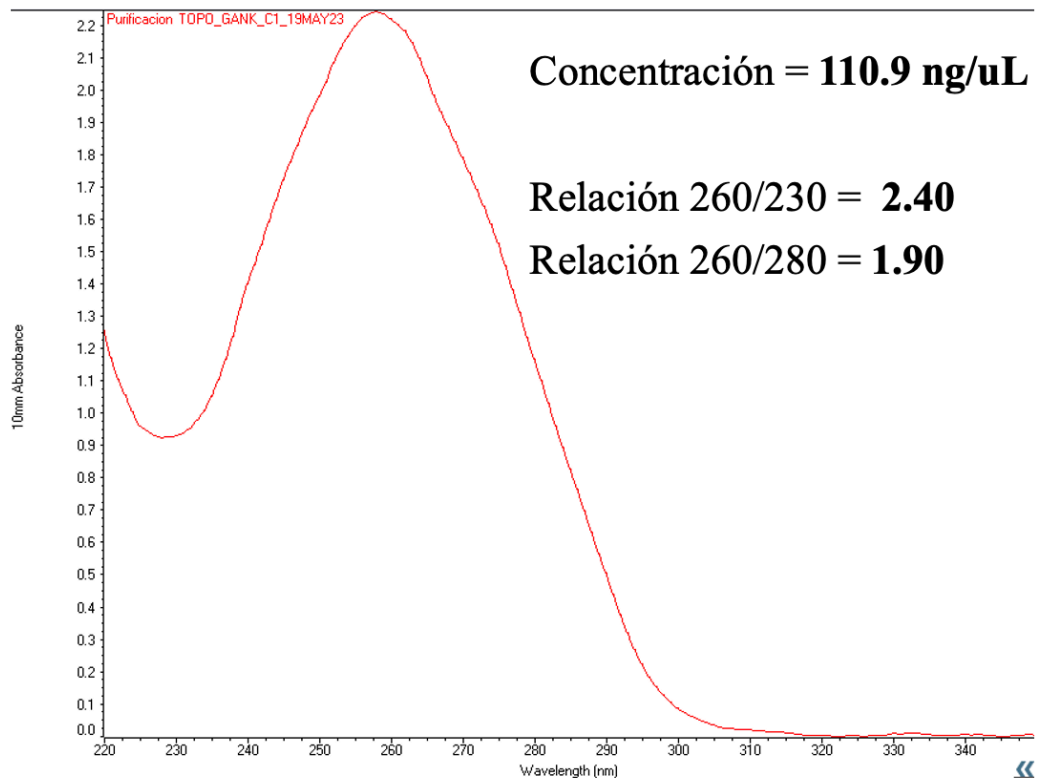


Figura 8. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp del vector pCR2.1TOPO + GANK. Determinación de la concentración [110.9 ng/ μ L] y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 del ADN plasmídico purificado por minipreparación columna a partir del candidato 1 transformado con la construcción pCR2.1TOPO + GANK.

Posteriormente, el análisis de la integridad del ADN purificado mostró la presencia de una banda correspondiente al tamaño de la construcción pCR2.1TOPO + GANK (Fig. 9).

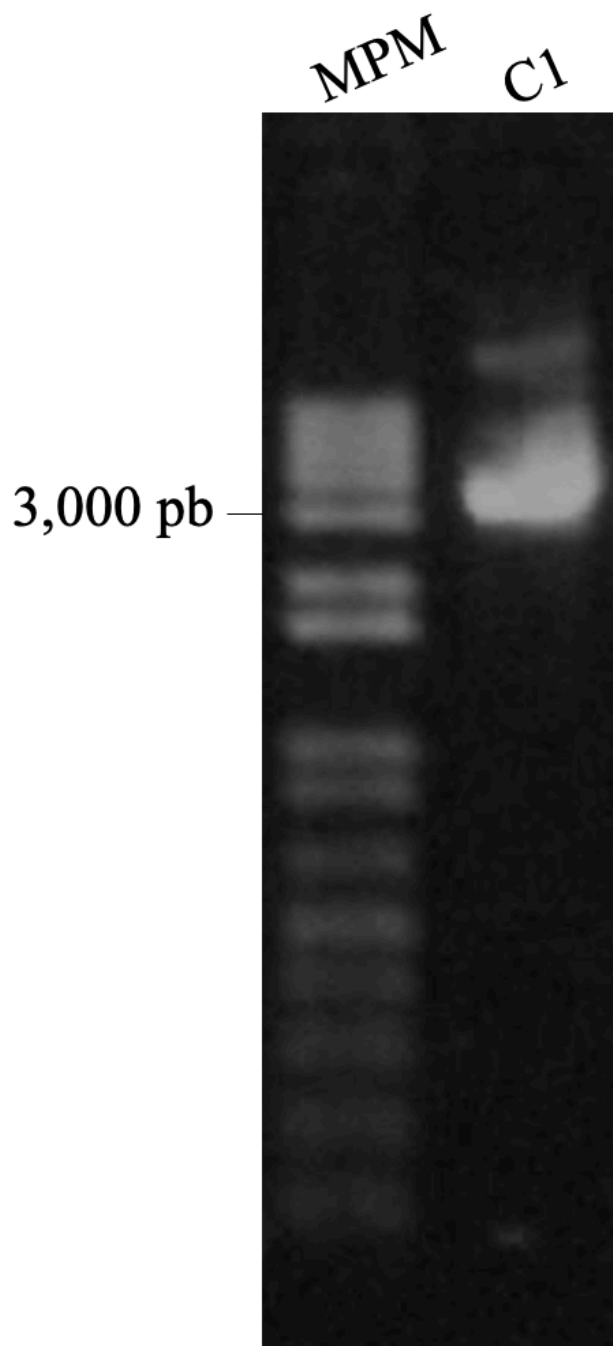


Figura 9. Análisis de integridad del ADN del vector pCR2.1TOPO + GANK. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad del ADN plasmídico purificado por minipreparación columna a partir del candidato 1 transformado con la construcción pCR2.1TOPO + GANK.

Una vez obtenido el material, este fue sometido a una reacción de marcaje empleando los iniciadores sentido y antisentido para la secuencia del bacteriofago M13 presente en el vector y posteriormente precipitado para secuenciación; donde el alineamiento de la secuencia resultante del análisis contra una secuencia referencia obtenida del NCBI (NM_002814.4) determinó el 100 % de fidelidad en la secuencia de *Gankyrin* (Fig. 10).

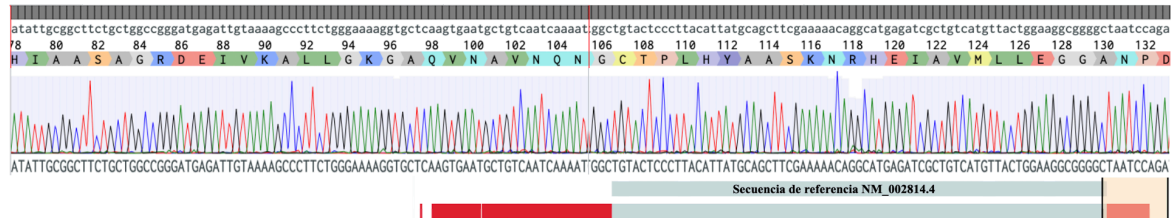
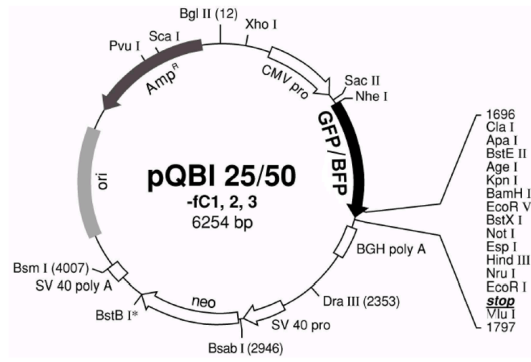


Figura 10. Caracterización y determinación de la fidelidad del inserto en la construcción pCR2.1TOPO + GANK. Electroferograma y secuencia del inserto alineada contra la secuencia de *Gankyrin* obtenida del NCBI (NM_002814.4). Se observó un 100 % de fidelidad con la secuencia de referencia.

Posterior a la caracterización enzimática y por secuenciación de la construcción pCR2.1TOPO + GANK y con la finalidad de subclonar el inserto en el vector pQBI-25 (Fig. 11 A), se realizó el escalamiento del cultivo transformado con la construcción pCR2.1TOPO + GANK para su purificación por midipreparación. Una vez purificado, el ADNp de ambos vectores se sometió a análisis de cuantificación (Fig. 11 B y C). En donde se obtuvieron concentraciones de [6,176 ng/ μ L] y [6,251 ng/ μ L] para los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 respectivamente. Adicionalmente, los resultados indicaron un radio de absorbancia para las relaciones 260/230 y 260/280 de 2.36 y 2.08 en el caso del vector pCR2.1TOPO + GANK y de 2.37 y 2.08 en el vector pQBI-25.

A.



B.

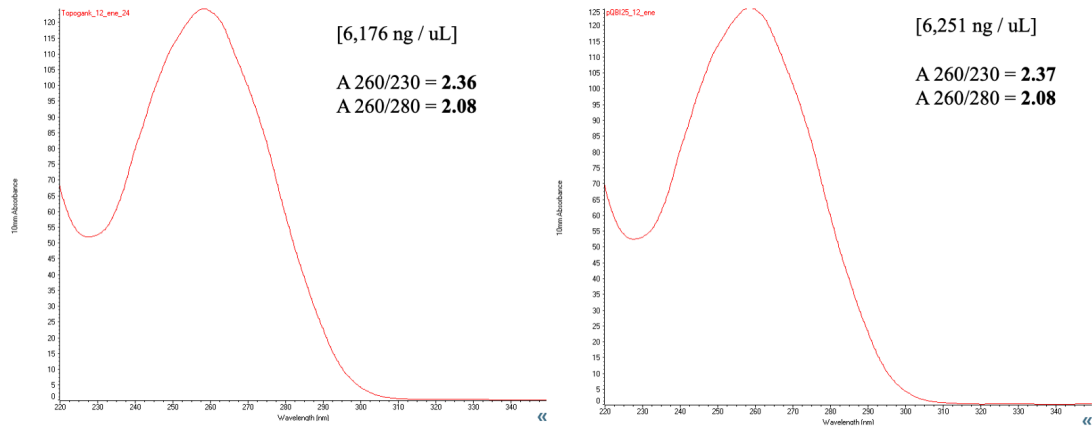


Figura 11. (A) Imagen representativa del vector pQBI-25. Se muestra el tamaño (6,254 pb) y la estructura del vector pQBI-25 conteniendo el sitio de origen de replicación, un promotor constitutivo CMV que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) o de secuencias de inserción con sitios de restricción para las enzimas NheI y SacII, un sitio múltiple de clonación para la generación de proteínas de fusión con GFP y la presencia de genes de resistencia a ampicilina y neomicina. **(B) Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25.** Determinación de la concentración y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 de los ADN plasmídicos purificados por midipreparación.

La integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (Fig. 12).

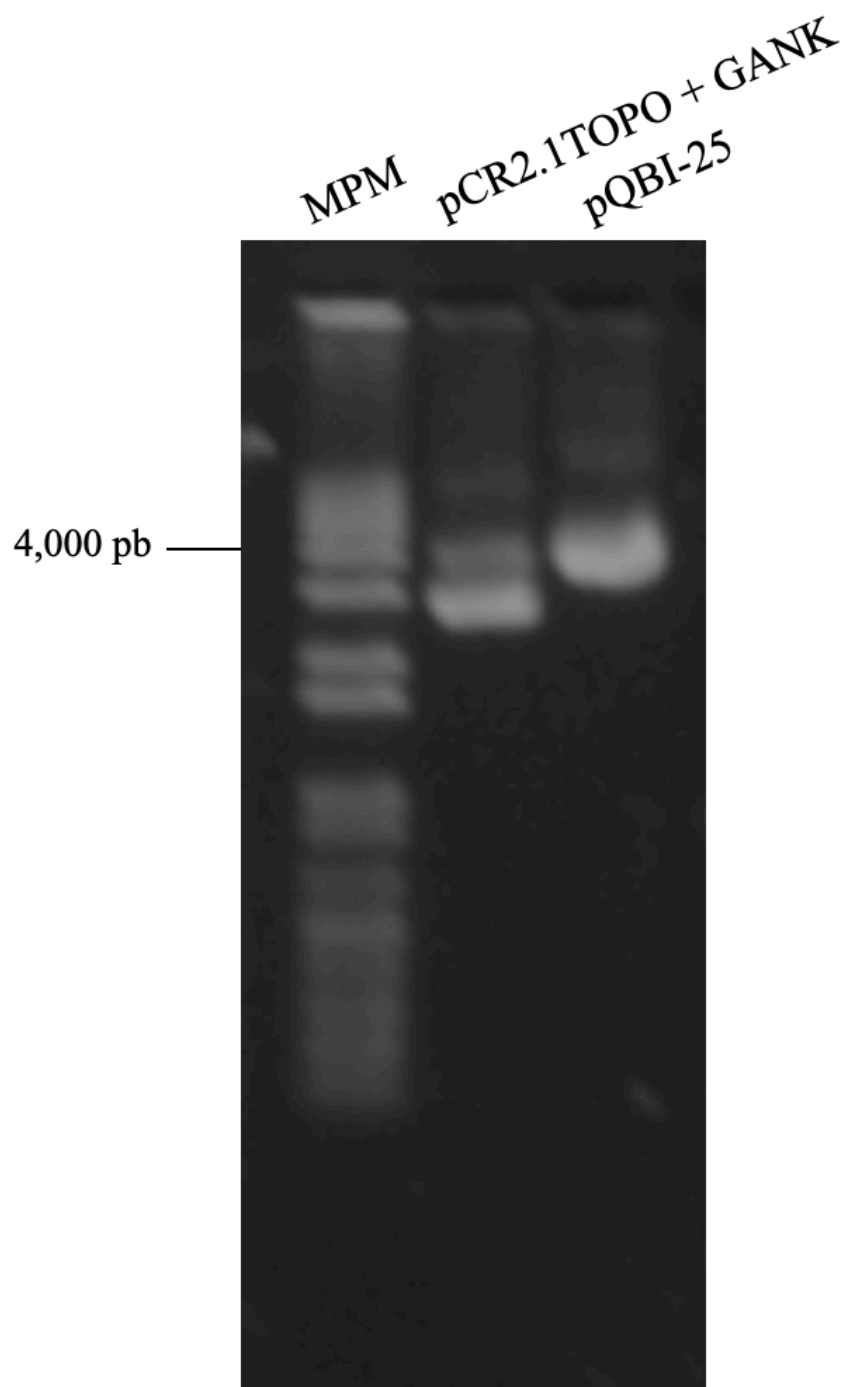


Figura 12. Análisis de integridad del ADN de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad de los ADN plasmídicos purificados por midipreparación.

Una vez determinada la disponibilidad y pureza del material genético, se procedió con la digestión enzimática de la construcción pCR2.1TOPO + GANK y la linearización del vector pQBI-25 con la enzima NheI, la cual permitió la liberación del fragmento de *Gankyrin* y la generación de extremos cohesivos compatibles con el sitio de restricción para la misma enzima ubicado río abajo del promotor CMV en el vector aceptor (Fig. 13).

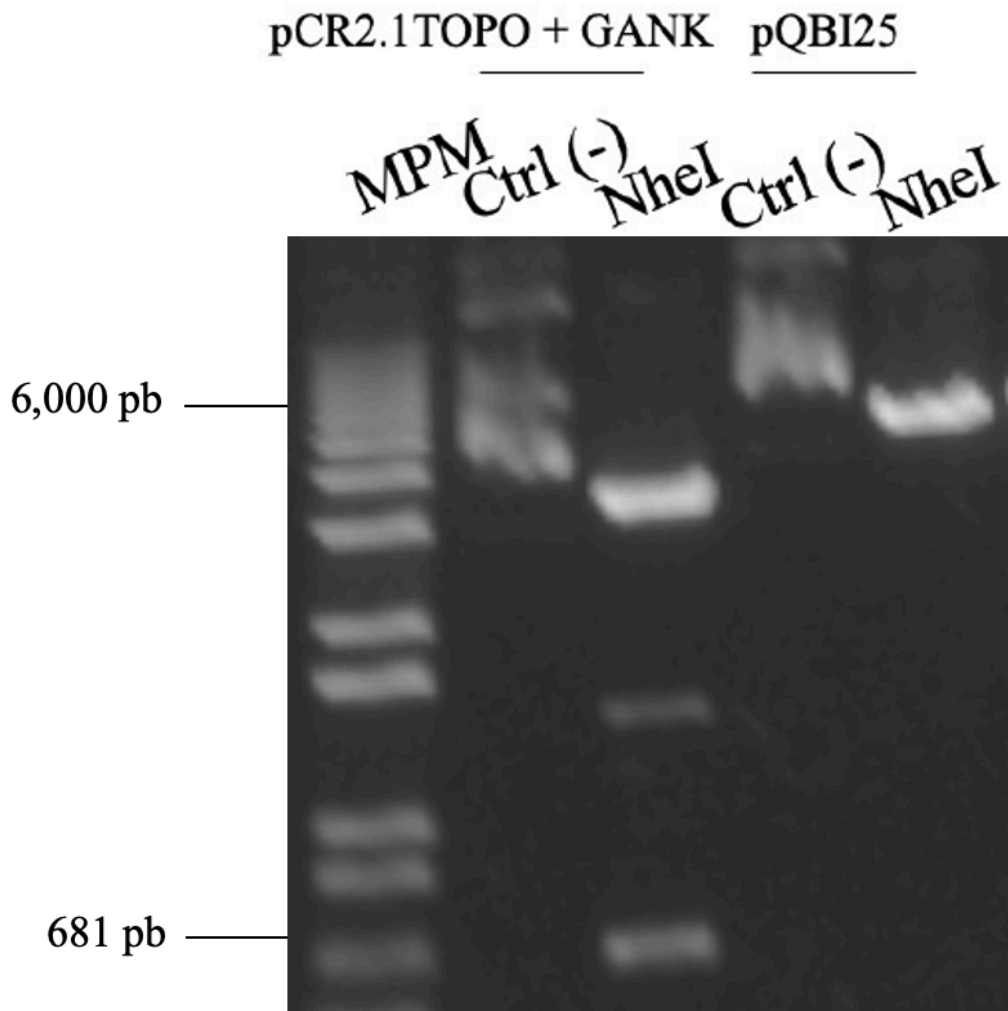
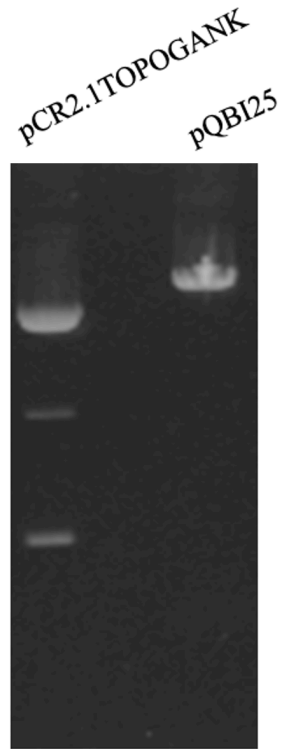


Figura 13. Digestión enzimática de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 con NheI. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; Ctrl (-). - Control negativo. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la digestión enzimática de los vectores pCR2.1TOPO + GANK con la enzima NheI (liberación del fragmento) y pQBI-25 (linearización). Los controles negativos se sometieron a las mismas condiciones en ausencia de enzima.

Con la finalidad de ligar el fragmento generado en el vector pQBI-25, los volúmenes de las reacciones de digestión fueron sometidos a corrimiento electroforético en gel de agarosa 1 % para su posterior purificación a partir de gel de agarosa (Fig. 14 A). Posteriormente, se realizó el análisis espectrofotométrico para la determinación de la concentración y pureza de las muestras (Fig. 14 B).

A.



B.

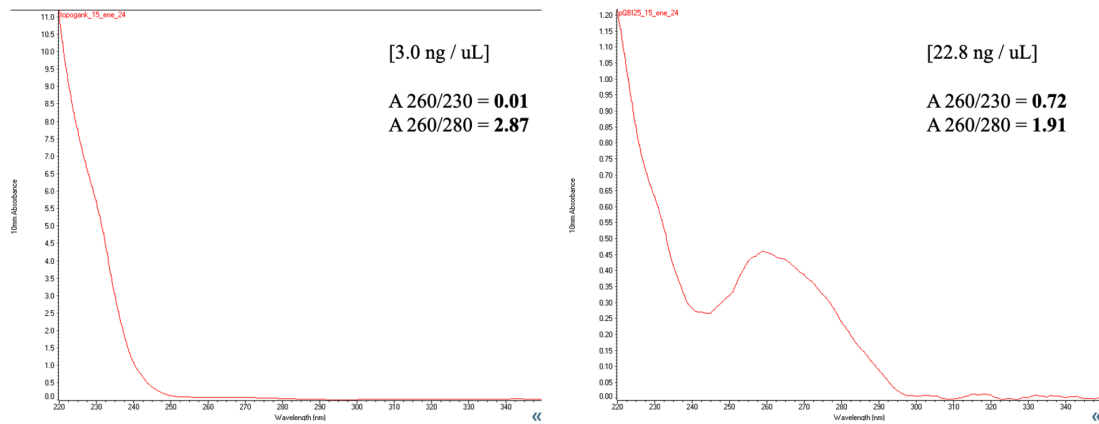


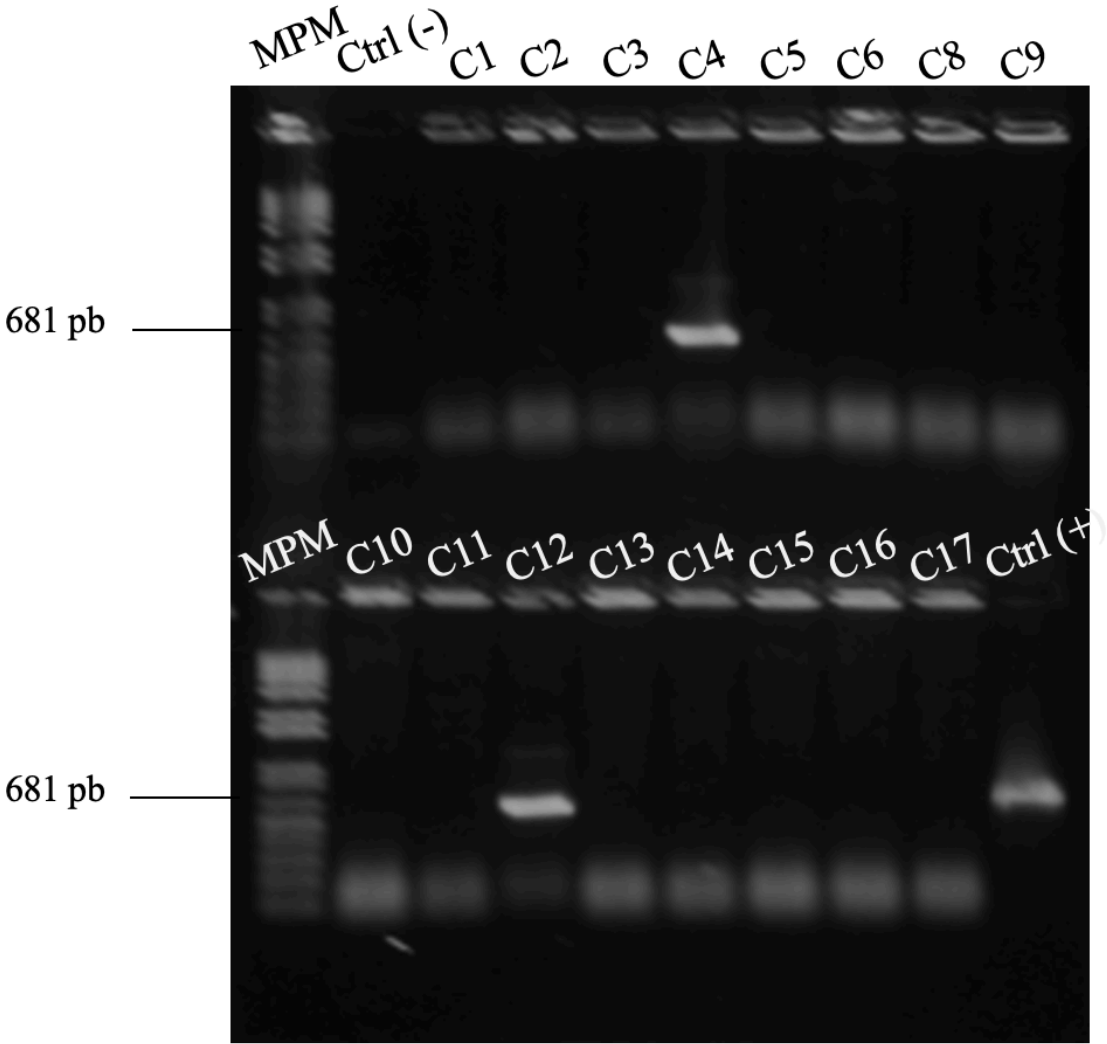
Figura 14. (A) Digestión enzimática de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 con NheI. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de las muestras correspondientes a los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 digeridas con NheI (pre-purificación). **(B) Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp de los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25.** Determinación de la concentración y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 de los ADN plasmídicos digeridos con la enzima NheI y purificados por a partir de gel de agarosa.

Posteriormente se visualizó la presencia de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (Fig. 15).



Figura 15. Determinación de la presencia de material purificado a partir de gel de agarosa. Electroforesis en gel de agarosa 1 % del fragmento correspondiente a *Gankyrin* y el vector pQBI-25 linearizado purificados a partir de gel de agarosa.

Una vez efectuada la purificación, los productos fueron sometidos a ligación en el vector pQBI-25. Transcurridas 24 h, las colonias fueron analizadas mediante PCR para la identificación de los candidatos portadores de la construcción pQBI-25 + GANK empleando iniciadores dirigidos hacia *Gankyrin* (Fig. 16).



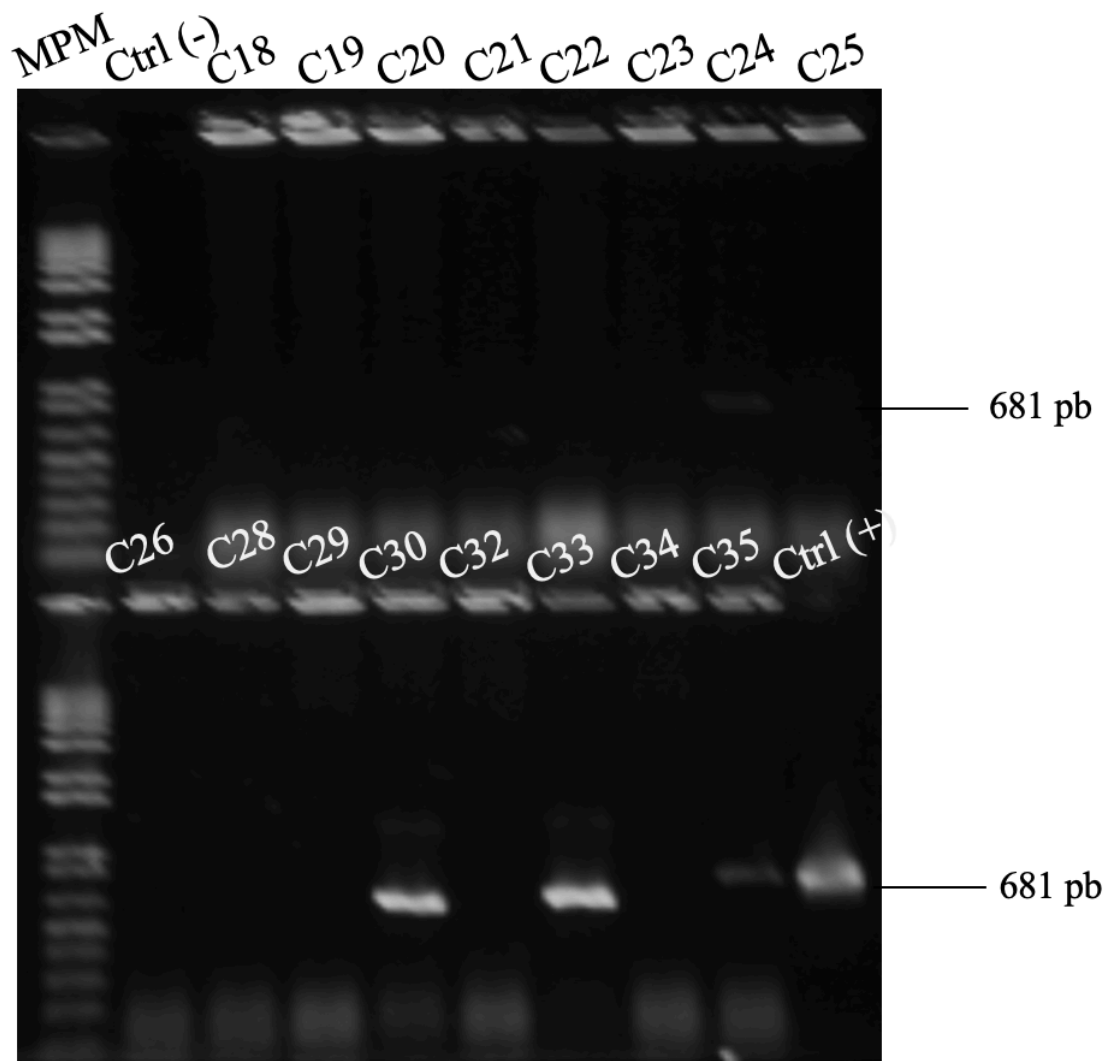


Figura 16. Identificación de candidatos por PCR de colonias. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n); Ctrl (-). - Control negativo; Ctrl (+). - Control positivo. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de PCR de los posibles candidatos portadores del gen de interés. Se observan fragmentos de 681 pb correspondientes a *Gankyrin* en los candidatos 4, 12, 24, 30, 33 y 35; como control positivo se empleó cDNA de HepG2.

Posterior a la identificación de los candidatos portadores del gen de interés, se procedió con su aislamiento y propagación. Transcurridas 24 h, se realizó la purificación del ADN plasmídico por lisis alcalina minipreparación. El material obtenido fue sometido a análisis espectrofotométrico para la determinación de la concentración y pureza (Fig. 17 A-F).

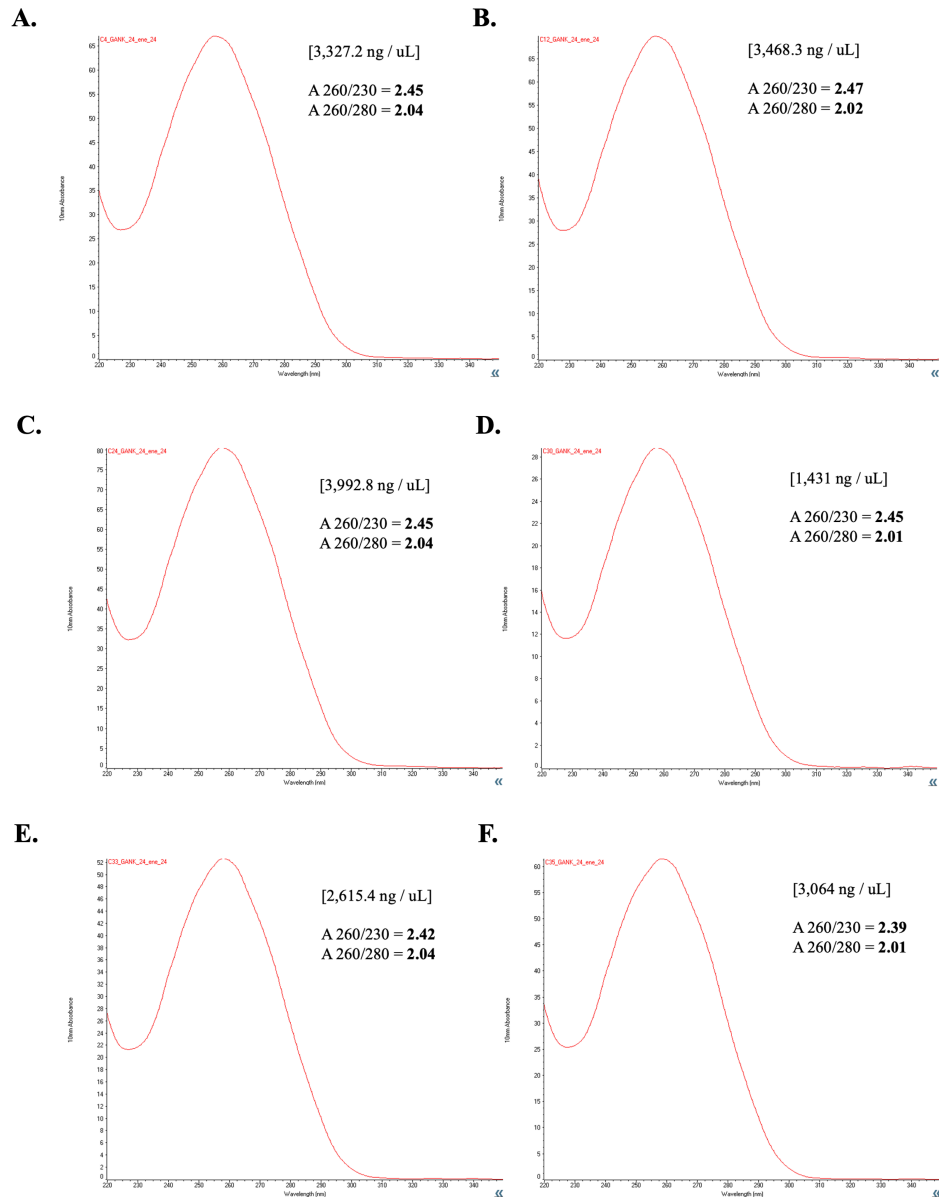


Figura 17. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK. Determinación de la concentración y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 de los ADN plasmídicos de los candidatos positivos para la construcción pQBI-25 + GANK purificados mediante lisis alcalina minipreparación. **(A)** candidato no. 4. **(B)** candidato no. 12. **(C)** candidato no. 24. **(D)** candidato no. 30. **(E)** candidato no. 33. **(F)** candidato no. 35.

Para estas muestras también se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad del ADN purificado (Fig. 18).

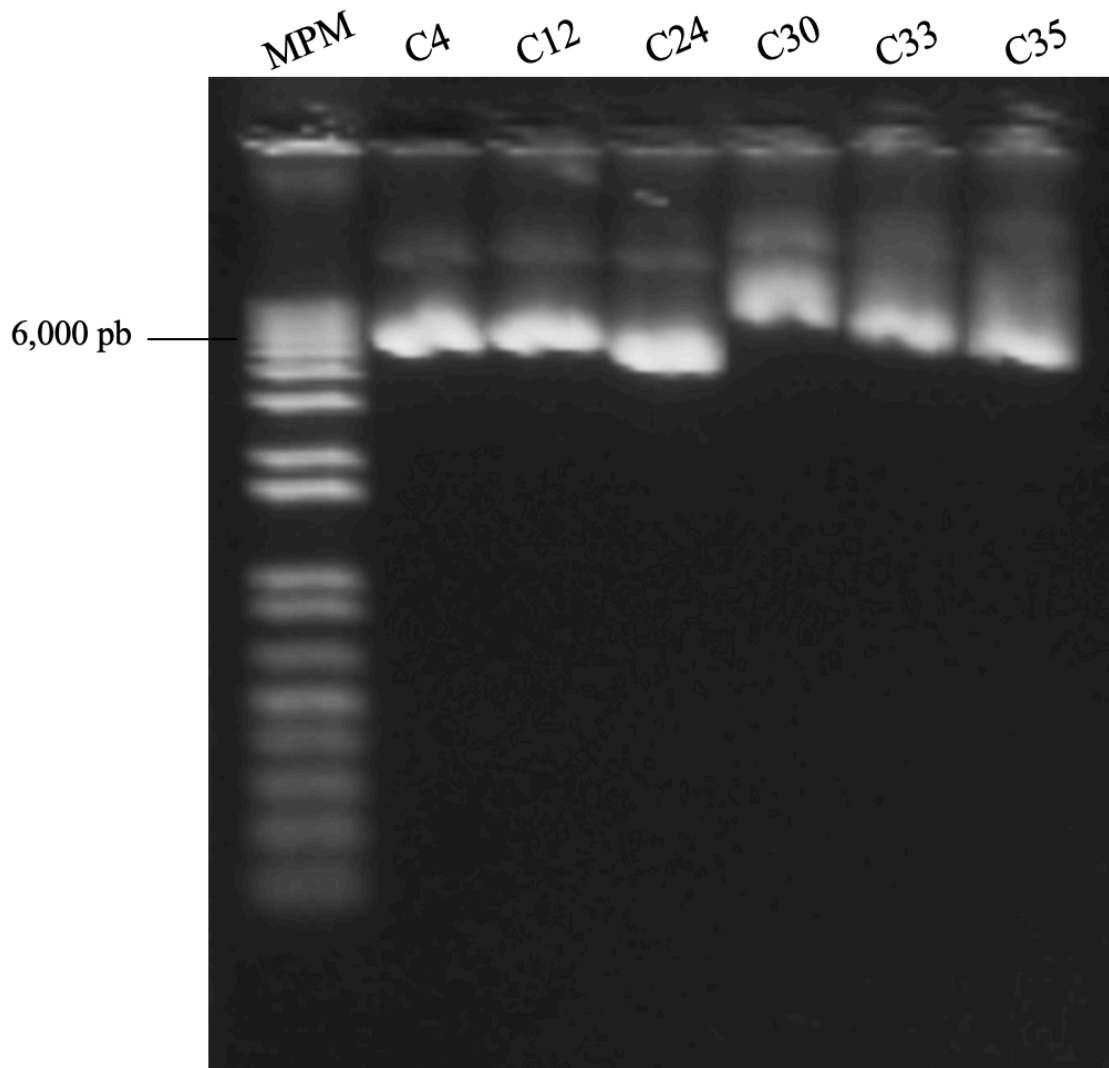


Figura 18. Análisis de integridad del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad de los ADN plasmídicos purificados por minipreparación.

Una vez purificado el ADN plasmídico y con la finalidad de continuar con la caracterización de la construcción pQBI-25 + GANK, se realizó un análisis de restricción con la enzima MscI que permitiría con base en el patrón de digestión visualizado en gel de agarosa 1 % determinar la inserción en el vector pQBI-25, así como la orientación del inserto (Fig. 19).

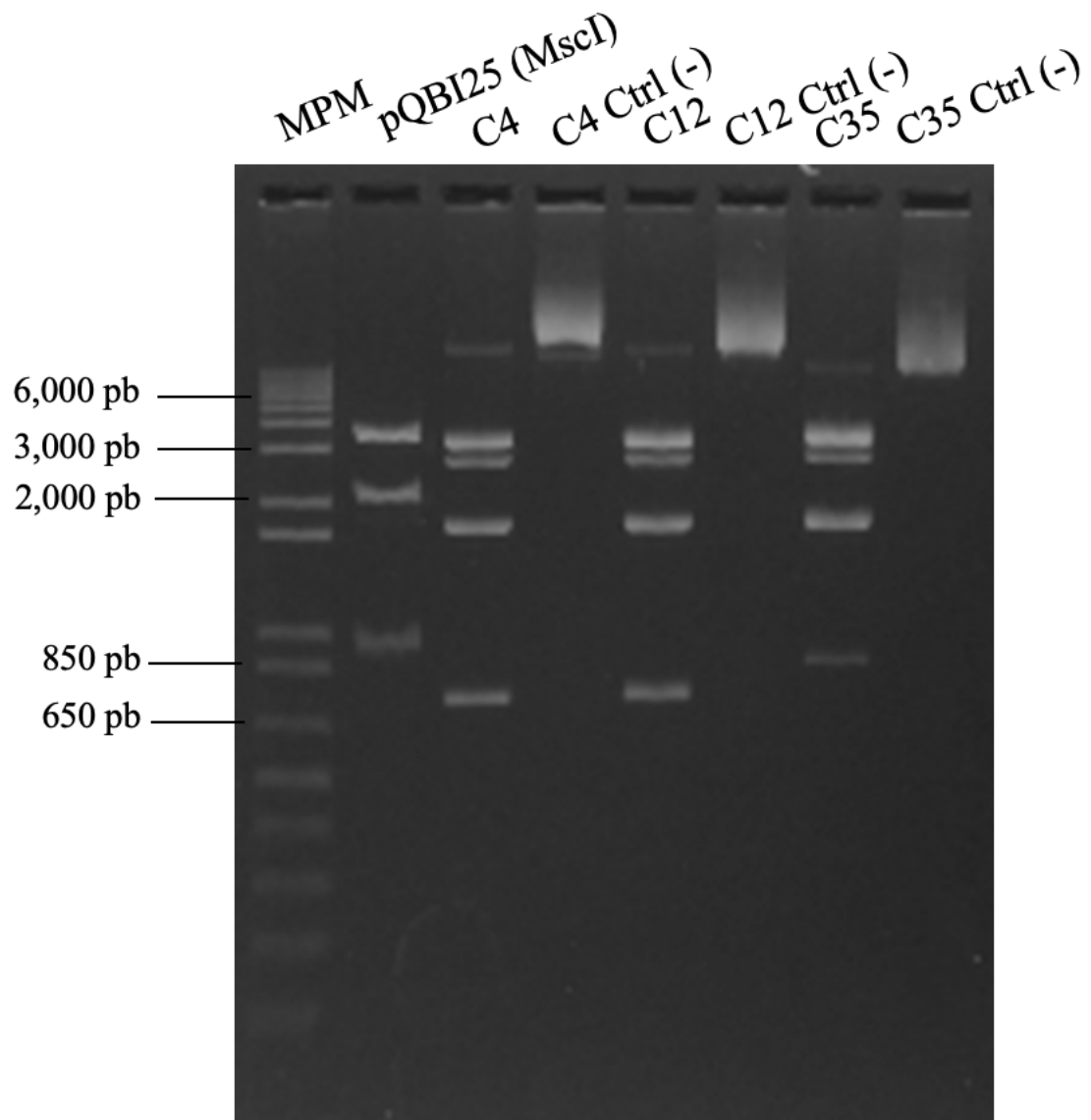


Figura 19. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de las muestras correspondientes a los candidatos 4, 12 y 35 transformados con la construcción pQBI-25 + GANK digeridas con MscI; como controles se incluyeron el vector pQBI-25 sin inserto y ADN de los candidatos sin enzima.

No obstante, el patrón obtenido no coincidió con el obtenido mediante el análisis *in silico* (Fig. 20).

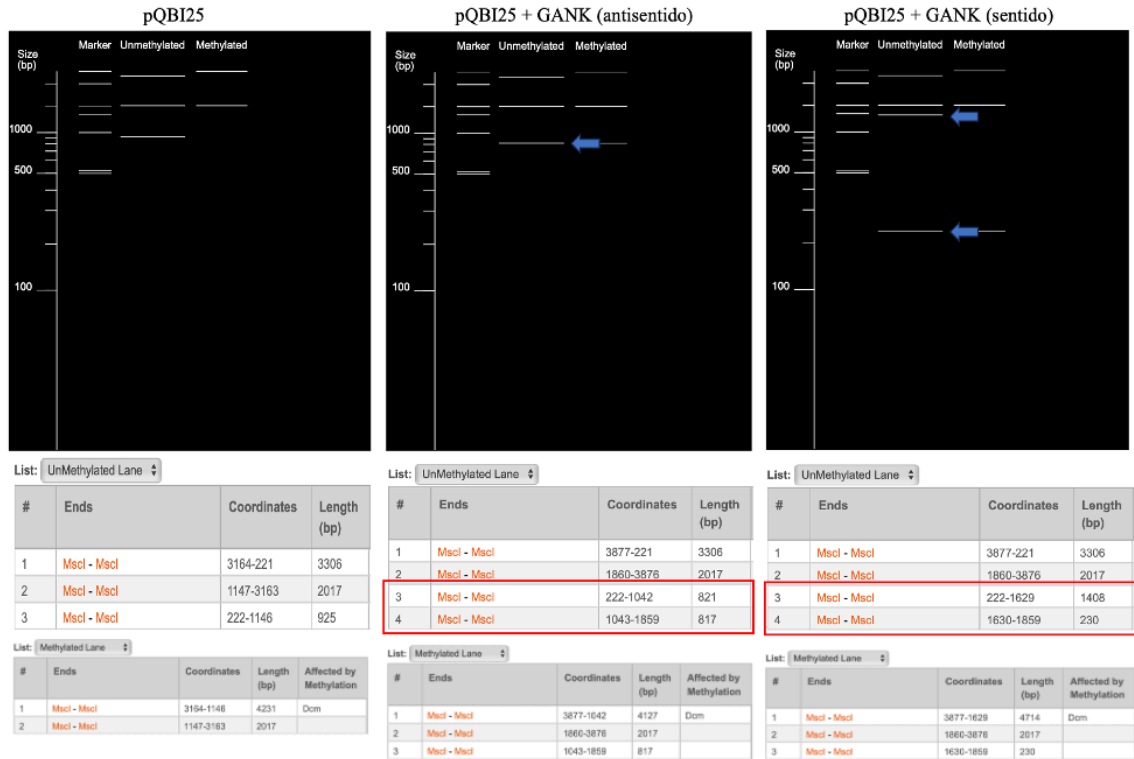


Figura 20. Análisis *in silico* de la digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI. Simulación de la digestión del vector pQBI-25 y las construcciones pQBI-25 + GANK en orientación sentido y antisentido con la enzima MscI. En rojo se muestran los tamaños de los fragmentos esperados para la determinación de la orientación de la secuencia correspondiente a *Gankyrin*.

Por lo anterior, se realizó una PCR punto final dirigida hacia *Gankyrin* utilizando como templado el ADN purificado con la finalidad de comprobar la presencia del inserto de interés (Fig. 21).

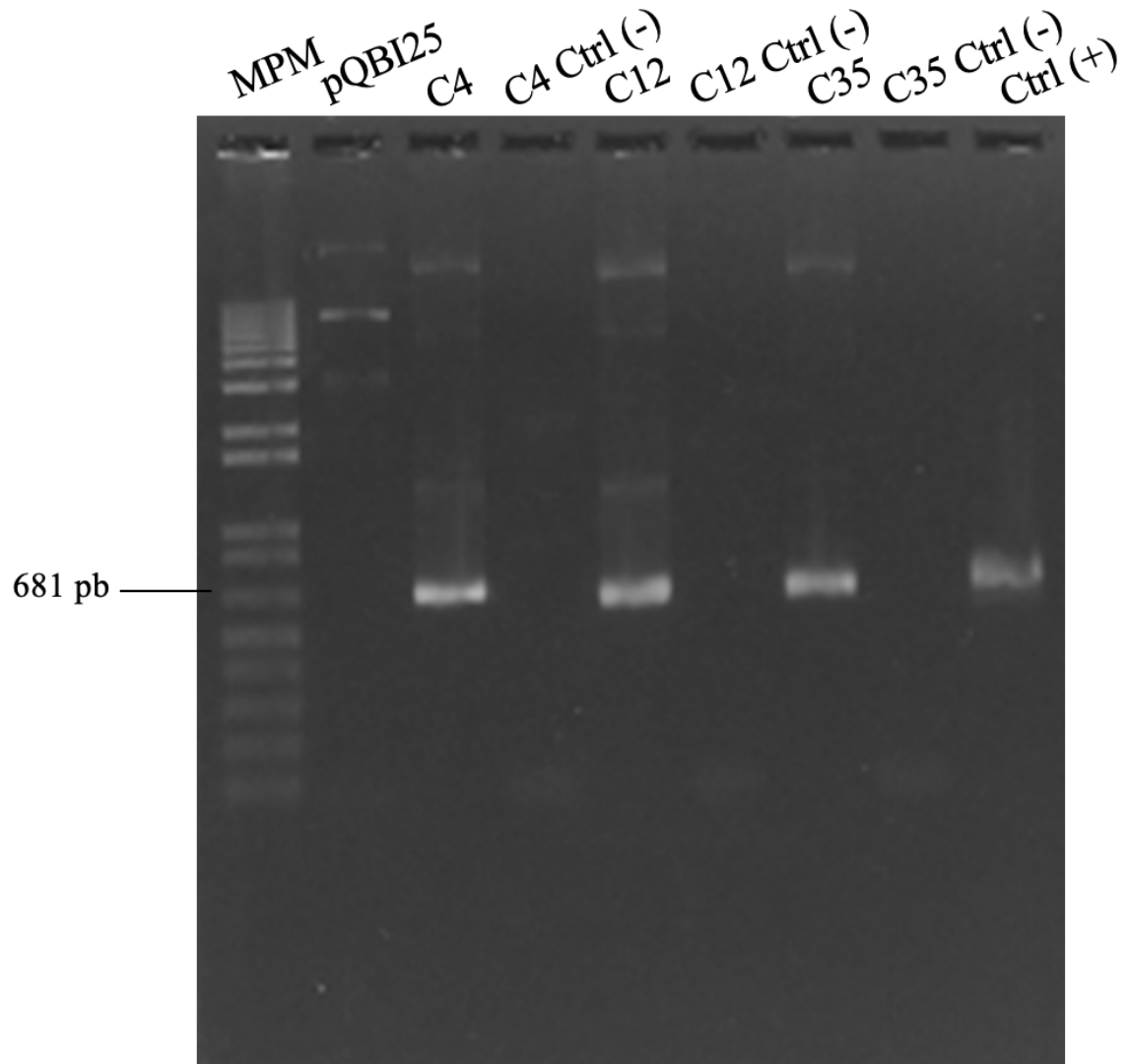


Figura 21. Amplificación del fragmento específico del gen *Gankyrin*. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Se observa la amplificación del fragmento específico de 681 pb a partir del ADN plasmídico proveniente de los candidatos 4, 12 y 35.

Una vez comprobada mediante PCR la presencia del gen de interés y con base en los resultados obtenidos, se optó por realizar la caracterización de la construcción pQBI-25 + GANK mediante secuenciación. Para ello, el ADN plasmídico de los candidatos purificados fue sometido a una reacción de marcaje y precipitación empleando un par distinto de iniciadores sentido y antisentido dirigidos hacia *Gankyrin*; donde el análisis por

secuenciación determinó la presencia y orientación antisentido del inserto dentro del vector pQBI-25 en la muestra correspondiente al candidato 12 (Fig. 22).

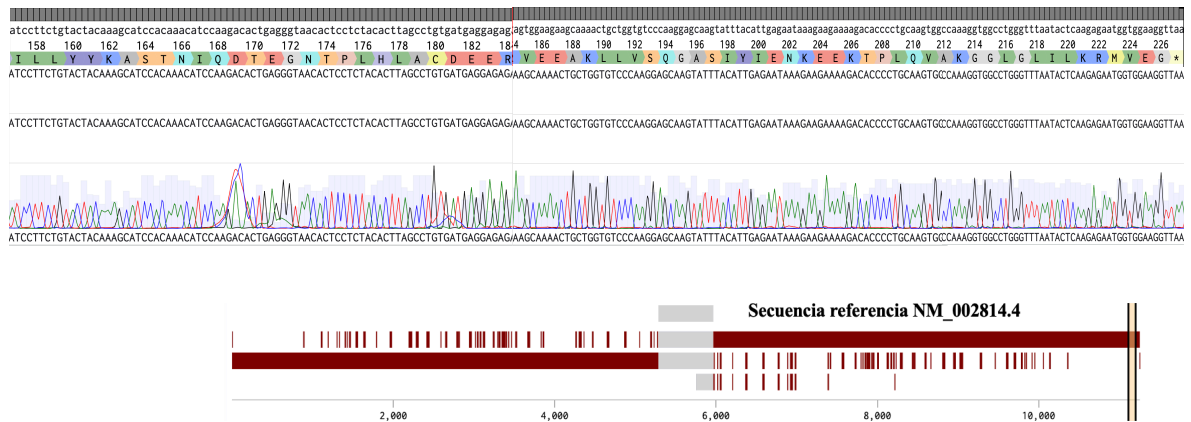


Figura 22. Caracterización y determinación de la fidelidad del inserto en la construcción pQBI-25 + GANK. Electroferograma y secuencia del inserto alineada contra las secuencias de las construcciones pQBI-25 + GANK sentido y antisentido y la secuencia de referencia de *Gankyrin* obtenida del NCBI (NM_002814.4). Se observó un 100 % de fidelidad con la secuencia de referencia. Asimismo, se determinó la orientación antisentido de *Gankyrin*.

El resto de los candidatos analizados no mostraron un electroferograma de buena calidad compatible para análisis posteriores. Por lo que, previo a continuar con la estrategia de caracterización, fueron sometidos a digestión enzimática con la enzima BamHI, ya que presenta sitios de corte dentro de la secuencia río abajo de los sitios de restricción para NheI. El resultado de este análisis comprobó la presencia del inserto en los candidatos analizados a excepción del candidato 24, por lo que se excluyó de análisis posteriores (Fig. 23).

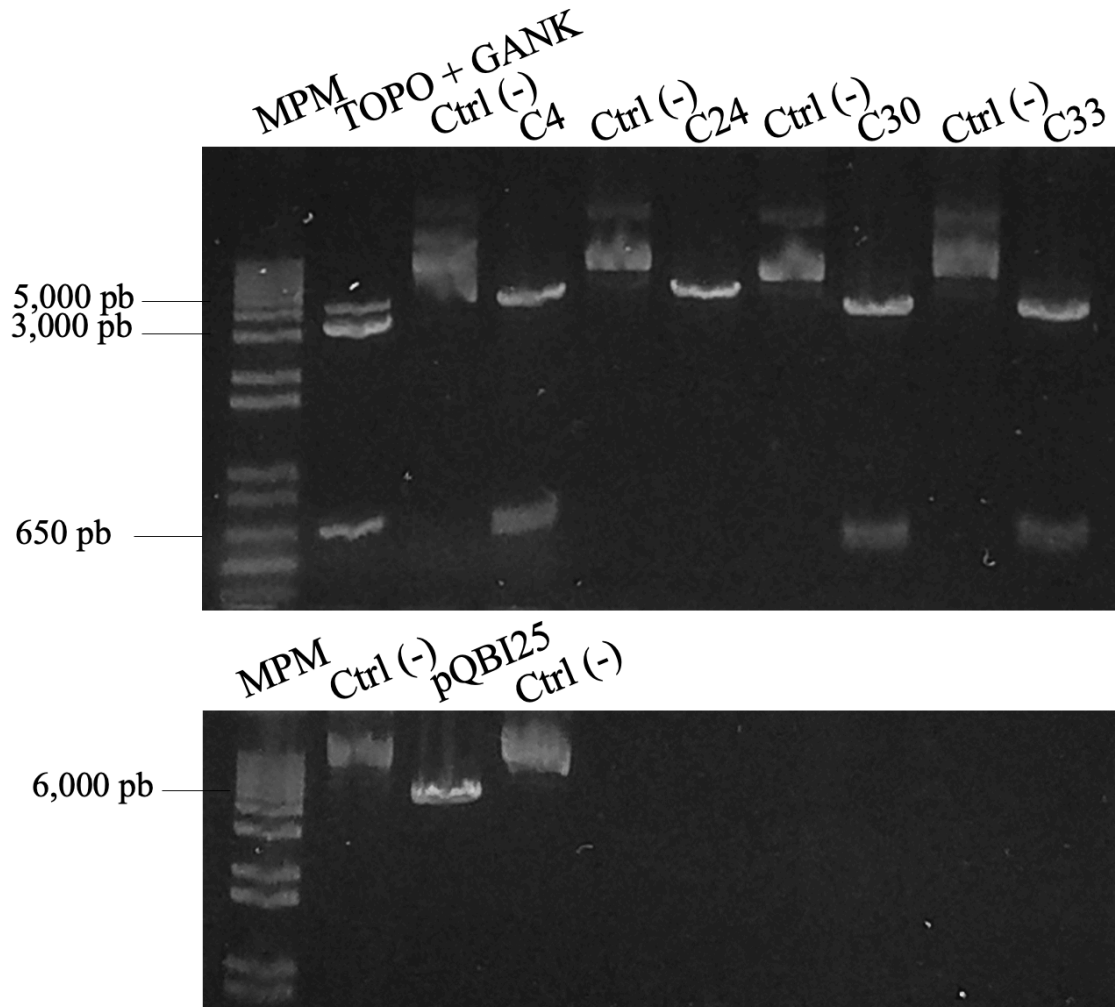


Figura 23. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con BamHI. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de las muestras correspondientes a los candidatos 4, 24, 30 y 33 transformados con la construcción pQBI-25 + GANK digeridas con BamHI; como controles se incluyeron los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 sin inserto, así como ADNp de los candidatos sin exposición a la enzima.

Una vez identificados y caracterizados por múltiples medios los candidatos portadores del gen de interés y con la finalidad de determinar la orientación del inserto, se realizó la digestión del ADN plasmídico con la enzima MscI anteriormente probada. Los patrones de digestión obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, se analizaron y compararon con los patrones obtenidos mediante digestión *in silico* (Fig. 24).

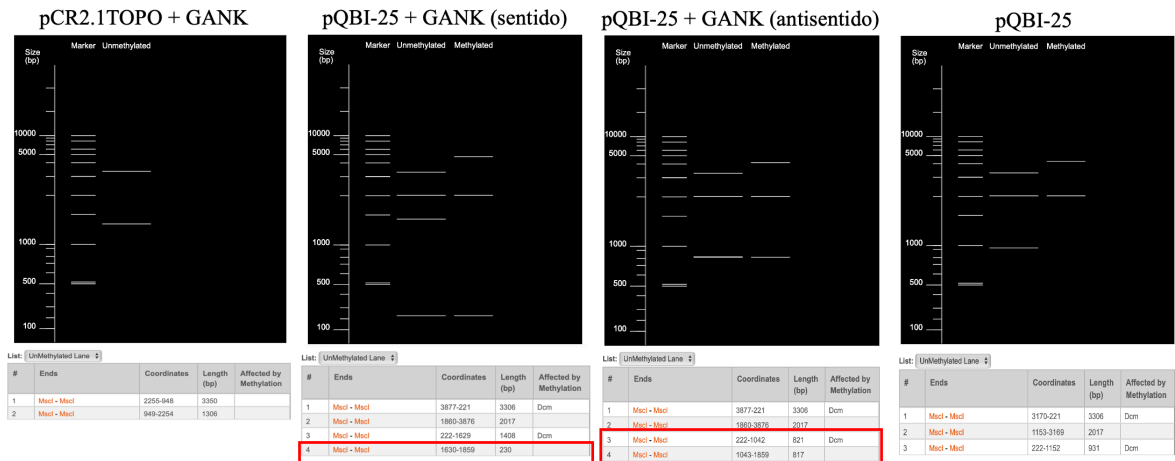


Figura 24. Análisis *in silico* de la digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI. Simulación de la digestión de los vectores pCR2.1TOPO + GANK, pQBI-25 y de las construcciones pQBI-25 + GANK en orientación sentido y antisentido con la enzima MscI. En rojo se muestran los tamaños de los fragmentos esperados para la determinación de la orientación de la secuencia correspondiente a *Gankyrin*.

Con base en los resultados, se determinaron dos inserciones de *Gankyrin* en orientación sentido (candidatos 30 y 33), caracterizados por la presencia de bandas de 230 pares de bases y dos en antisentido (candidatos 4 y 12), identificados por su patrón de migración superior a los 800 pares de bases (Fig. 25).

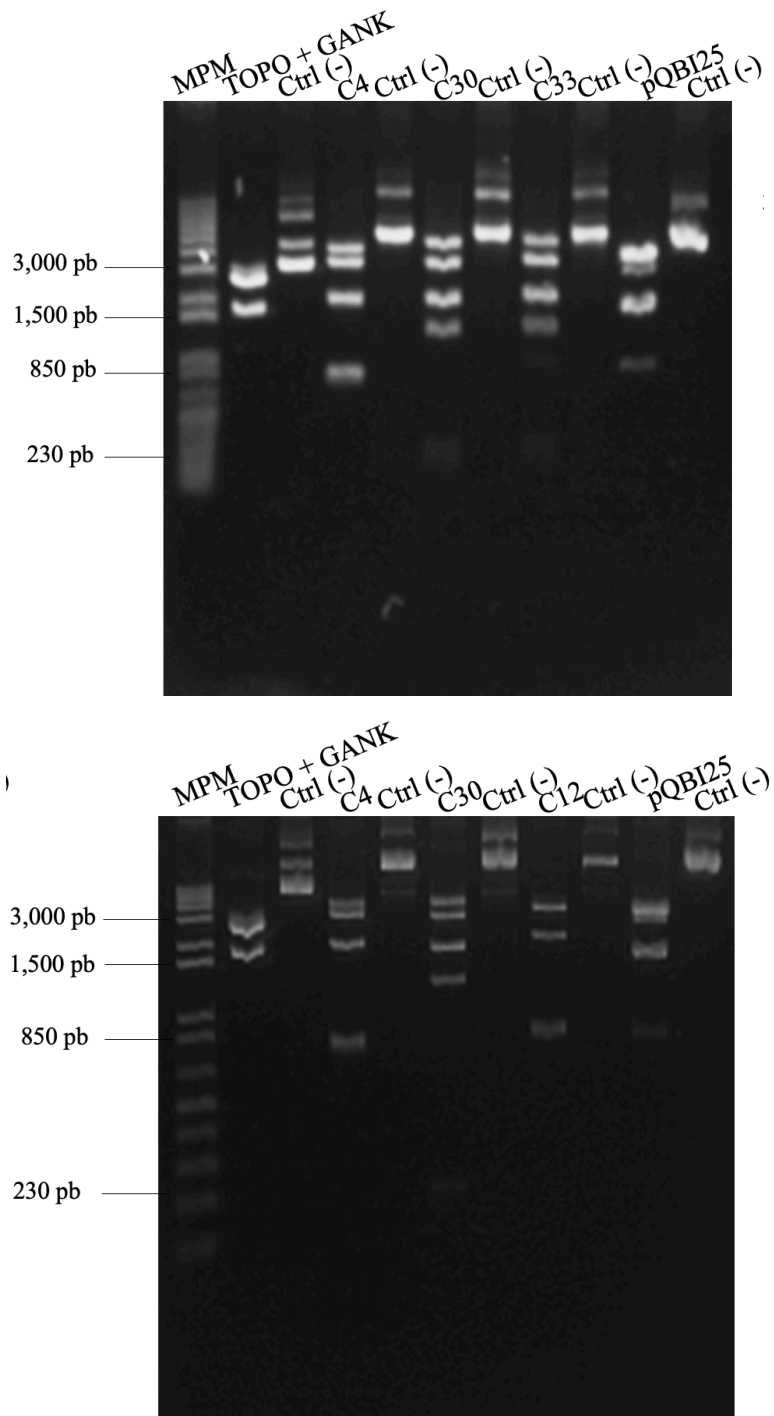
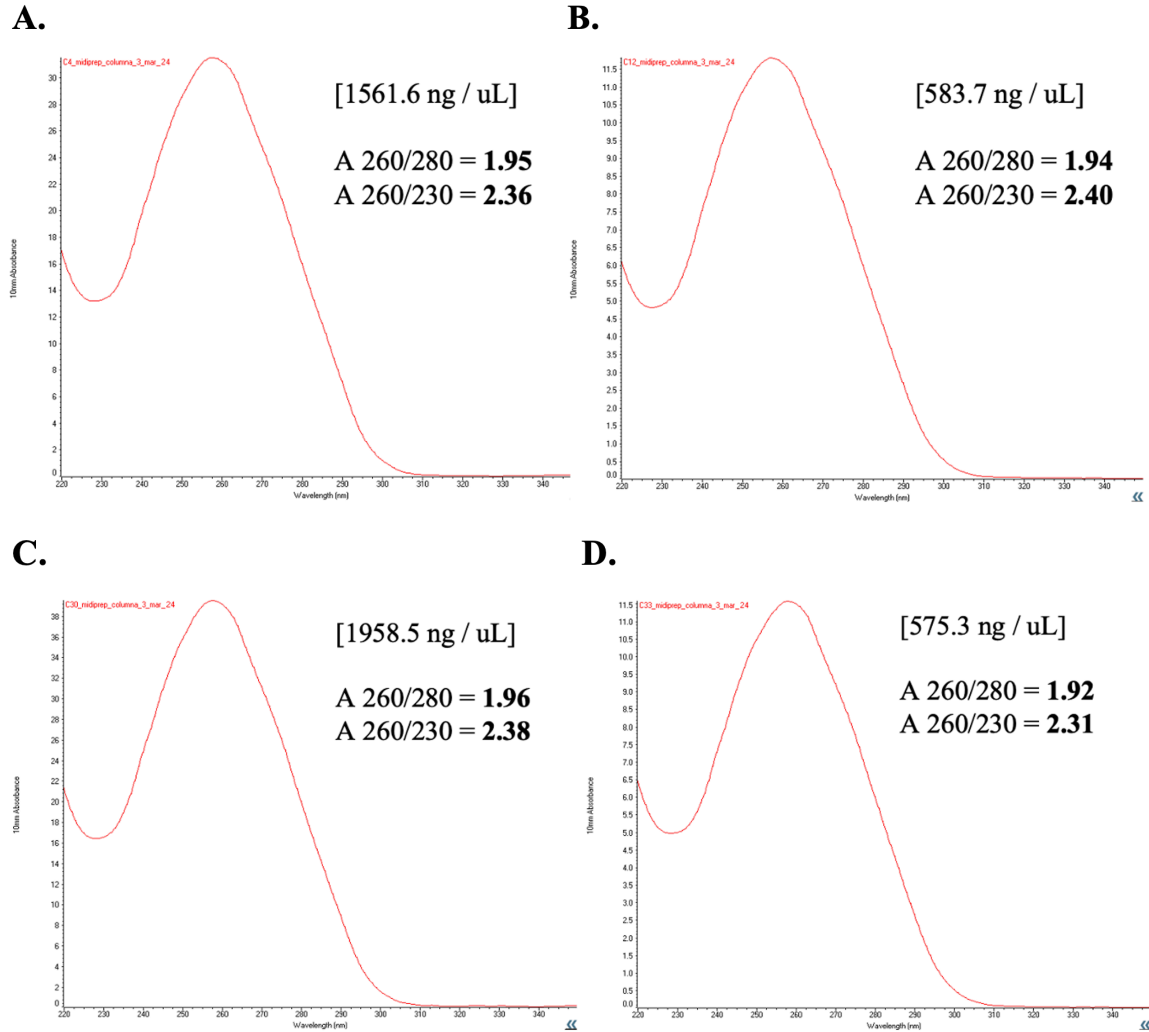


Figura 25. Digestión enzimática de la construcción pQBI-25 + GANK con MscI. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de las muestras correspondientes a los candidatos 4, 12, 30 y 33 transformados con la construcción pQBI-25 + GANK y digeridas con MscI; como controles se incluyeron los vectores pCR2.1TOPO + GANK y pQBI-25 sin inserto, así como ADNp de los candidatos sin exposición a la enzima.

Posterior a la determinación de la orientación de *Gankyrin* en el vector pQBI-25, se determinó la concentración y pureza del ADN purificado por midipreparación. El ADN purificado fue sometido a análisis espectrofotométrico para la determinación de la concentración y pureza (Fig. 26 A-D), así como a corrimiento electroforético en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad (Fig. 26 E).



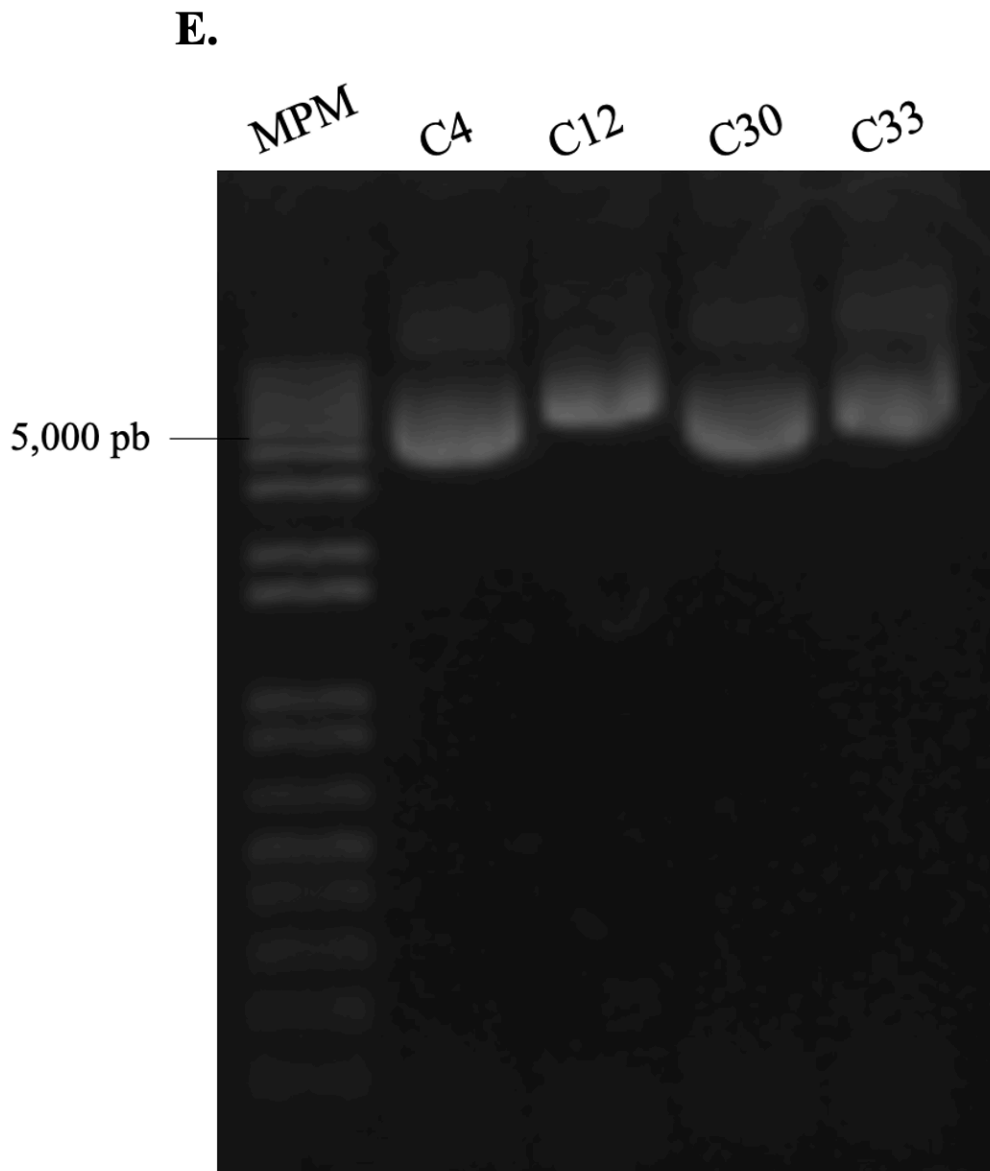


Figura 26. (A-E) Cuantificación y determinación de la integridad y pureza del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK. Determinación de la concentración y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 mediante espectrofotometría de los ADN plasmídicos de los candidatos positivos para la construcción pQBI-25 + GANK purificados mediante columnas para midipreparación (A) candidato no. 4. (B) candidato no. 12. (C) candidato no. 30. (D) candidato no. 33. (E) **Análisis de integridad del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK.** MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases; C(n). - Candidato (n). Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad de los ADN plasmídicos purificados por midipreparación columna.

Con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de *Gankyrin*, se realizó la transfección de las construcciones pQBI-25 + GANK en la línea celular 5637 mediante lípidos catiónicos como se describió en el apartado de materiales y métodos. Transcurridas 24 horas de la transfección, se monitoreó la presencia de señal verde fluorescente mediante microscopía confocal en las células transfectadas con el vector pQBI-25 sin inserto a manera de control (Fig. 27). Con base en la presencia de señal verde fluorescente se realizó el cálculo de la eficiencia de transfección, contando el total de células presentes y dividiéndose entre el total de células fluorescentes en un total de 6 campos analizados. A este tiempo se realizó la extracción de RNA y proteínas para análisis posteriores mediante RT-qPCR y Western Blot.

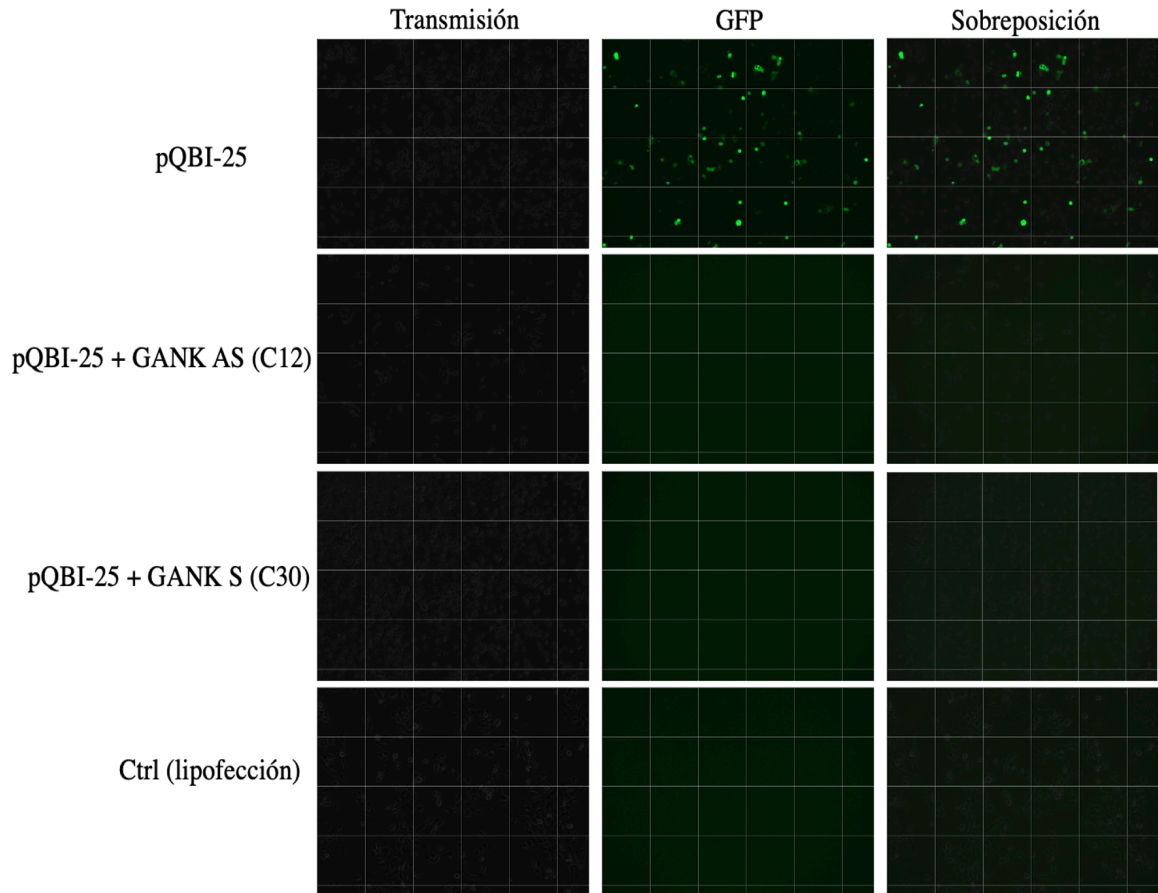


Figura 27. Microscopía por contraste de fases de la línea celular 5637 transfectada con las construcciones pQBI-25 + GANK sentido y antisentido. Se observa la presencia de señal verde fluorescente (GFP) en las células transfectadas con el vector pQBI-25 como control; así como la ausencia de la misma en las células transfectadas con *Gankyrin* en sentido y antisentido debido a la presencia de un codón de paro previo a la secuencia de la proteína verde fluorescente. Como control se incluyeron células transfectadas con el vector pQBI-25 sin inserto y células expuestas a lipofectamina. Todas las fotografías fueron capturadas bajo los siguientes parámetros: luz 27 %, GFP 40 % y 50 % de sobreposicionamiento.

Como paso previo al análisis por tiempo real, se realizó la extracción de ARN total como se describe en la sección de materiales y métodos. Se realizó la cuantificación de ARN total mediante espectrofotometría, así como la determinación de la pureza mediante las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280; obteniendo valores >1.8 (Fig. 28 A-D).

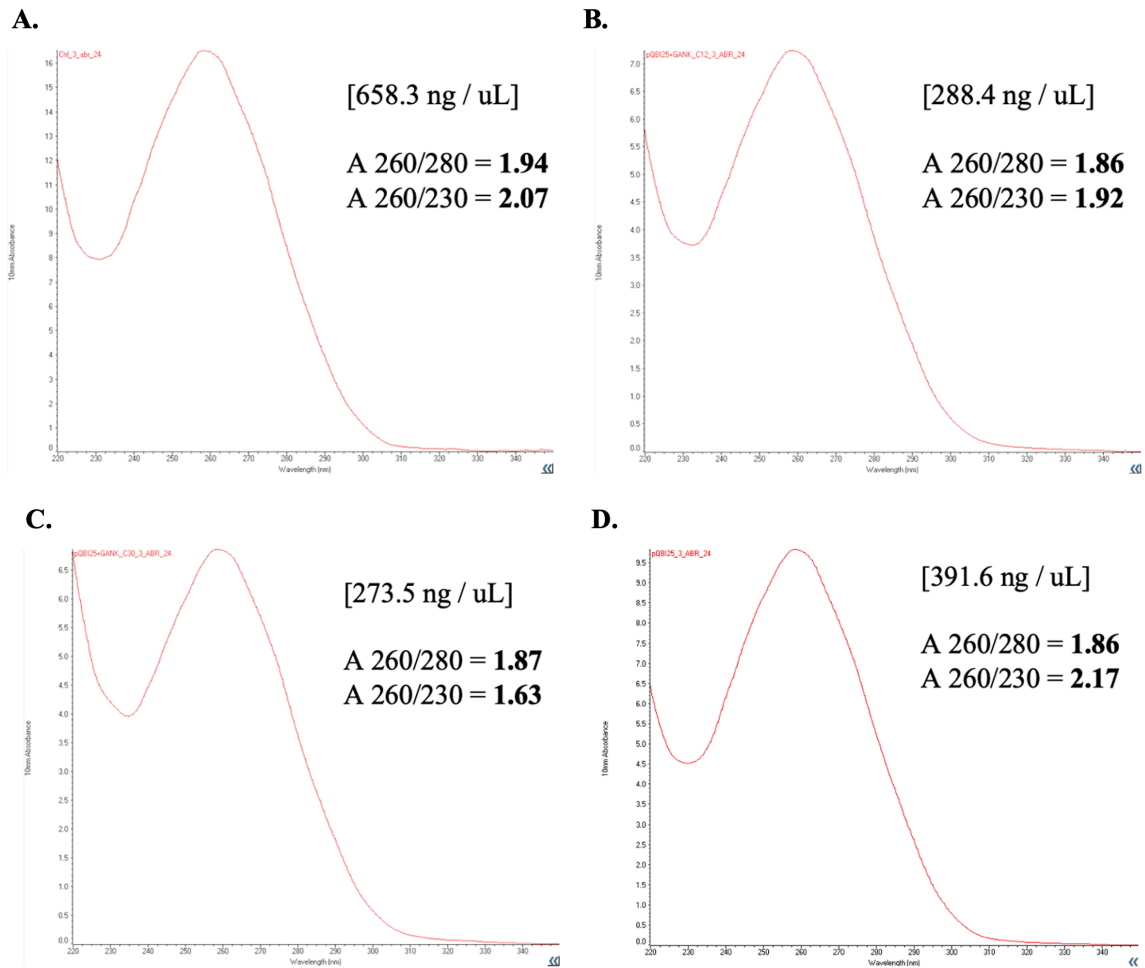


Figura 28. Cuantificación y determinación de la pureza mediante espectrofotometría del ARN total de las células transfectadas con las construcciones pQBI-25 + GANK sentido y antisentido. Determinación de la concentración y valores para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 del ARN total extraído con Trizol a partir de las células 5637 expuestas a lipofectamina **(A)** y células transfectadas con el vector **(B)** pQBI-25 + GANK AS (C12), **(C)** pQBI-25 + GANK S (C30) y **(D)** pQBI-25.

El análisis de la integridad del ARN se realizó mediante migración electroforética en gel de agarosa 1 % (Fig. 29) en el cual se identificaron las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 S y 18 S.

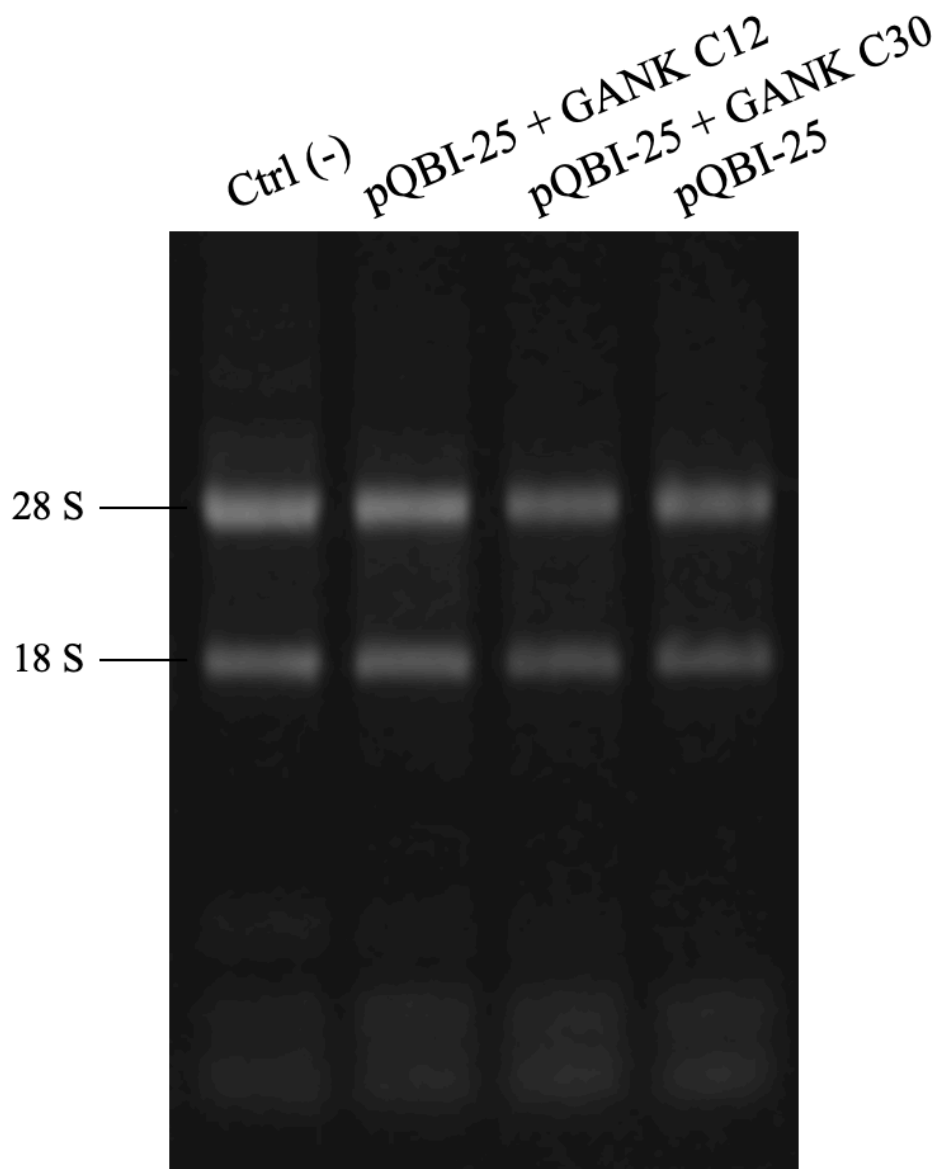


Figura 29. Análisis de integridad del ADNp de la construcción pQBI-25 + GANK. Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la visualización de la integridad de los ARN. Se observan las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 S y 18 S del ARN extrído de la línea celular 5637 transfectada con las construcciones pQBI-25 + GANK en sentido y antisentido; como control se incluyeron células trasnfectadas con el vector pQBI-25 sin inserto y células expuestas a lipofectamina.

Una vez visualizadas las bandas y con base en los resultados de la cuantificación. Los ARN extraídos fue sometidos a reacción de retrotranscripción. La evaluación de la funcionalidad del cDNA se realizó mediante PCR punto final dirigida a al gen *GAPDH*. Utilizando como templado los cDNA generados en la reacción de retrotranscripción y

como control positivo, cDNA proveniente de la línea celular HepG2. Los productos fueron sometidos a separación electroforética en gel de agarosa 1 % (Fig. 30) donde se observó la amplificación de un fragmento específico de 240 pb.

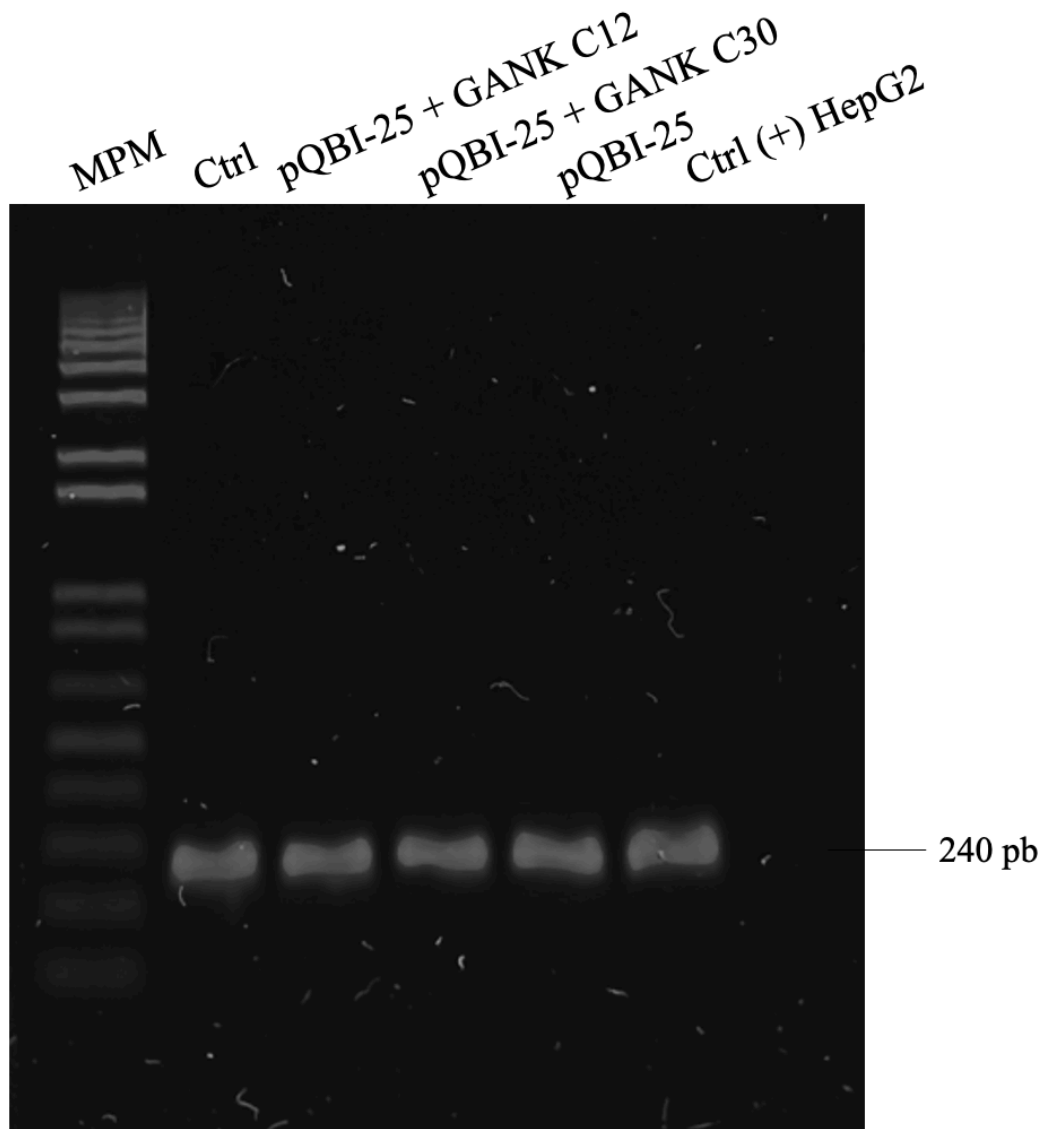


Figura 30. Amplificación del fragmento específico del gen *GAPDH*. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases. Se observa la amplificación del fragmento específico de 240 pb a partir de los cDNA provenientes de la reacción de retrotranscripción y como control positivo, cDNA obtenido de la línea celular HepG2.

Posteriormente, se realizó una PCR punto final dirigida a los genes *Gankyrin* y *GAPDH*, donde se usó como templado los cDNA obtenidos de la RT-PCR y empleando como controles mix de PCR sin templado (control negativo) y cDNA proveniente de HepG2 (control positivo). Los productos fueron sometidos a corrimiento electroforético en gel de agarosa 1 % (Fig. 31), donde se observó la amplificación de fragmentos específicos de 240 y 180 pb para *GAPDH* y *Gankyrin* respectivamente.

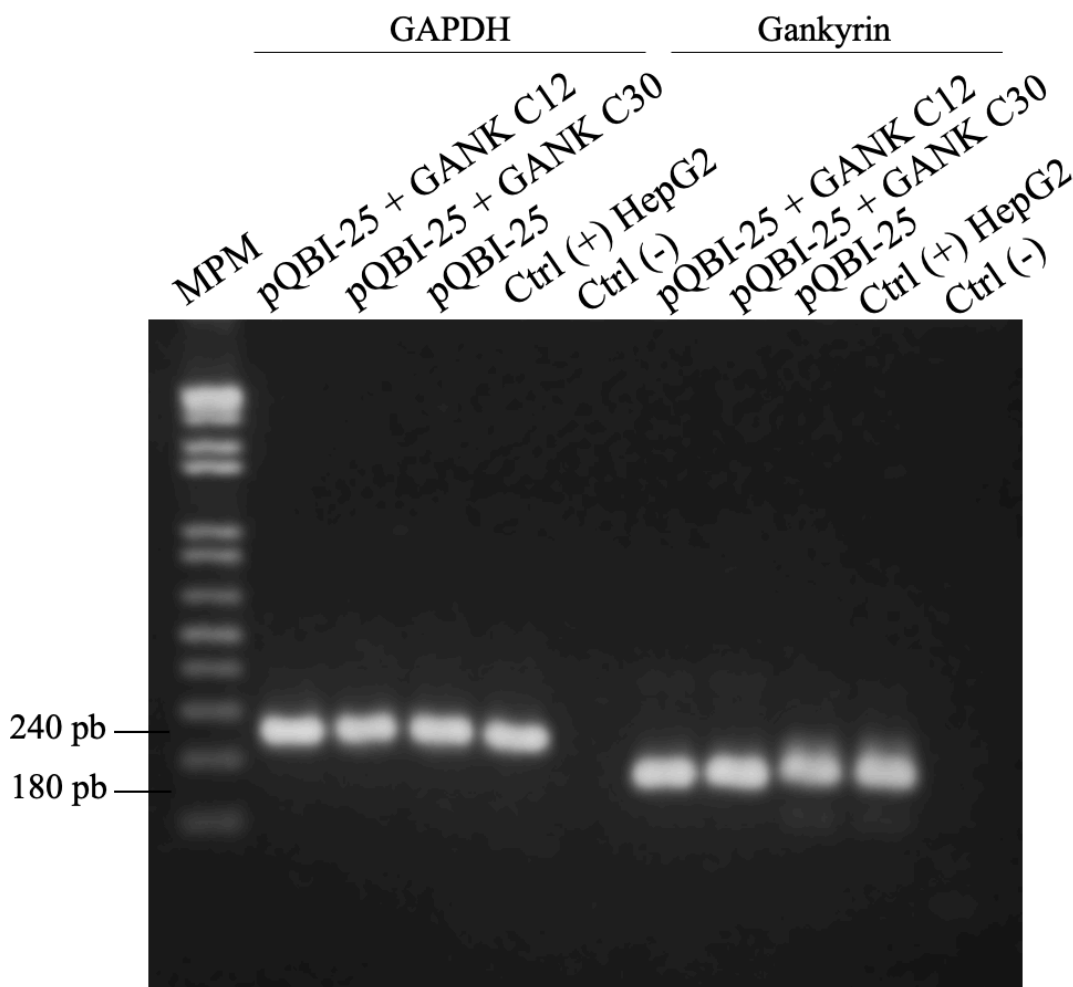


Figura 31. Amplificación del fragmento específico del gen *Gankyrin*. MPM. - Marcador de peso molecular; pb. - Pares de bases. Se observa la amplificación de los fragmentos específicos para *GAPDH* y *Gankyrin* de 240 y 180 pb, respectivamente a partir de los cDNA provenientes de la reacción de retrotranscripción. Como control negativo se empleó la mezcla de reactivos de PCR sin templado y como control positivo cDNA proveniente de HepG2.

Una vez identificada la presencia del transcrito de *Gankyrin*, se procedió a realizar la amplificación en tiempo real de *Gankyrin* utilizando SYBR-green®. Para ello, se utilizaron diluciones de cDNA en concentración 1:128 (Fig. 32 A) y como control endógeno se amplificó *GAPDH* (Fig. 32 B).

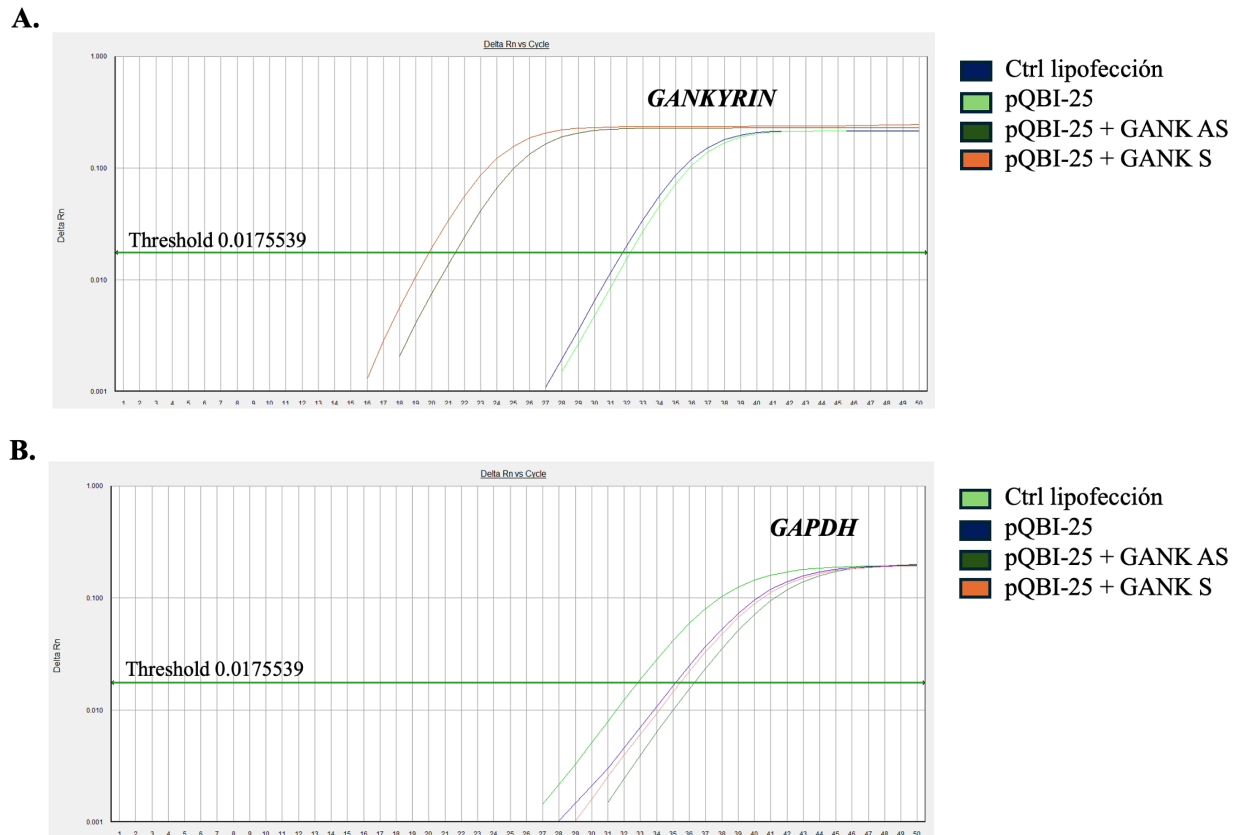


Figura 32. Amplificación de (A) *Gankyrin* y (B) *GAPDH* en la línea celular 5637. Las curvas de amplificación se muestran para los 4 grupos experimentales evaluados para la cuantificación de los niveles de expresión de *Gankyrin* a nivel de mRNA. Se observa el desplazamiento a la izquierda en los ciclos de amplificación de las muestras pQBI-25 + GANK S y pQBI-25 + GANK AS producto del aumento en la cantidad de transcrito de *Gankyrin* en comparación con el control (pQBI-25). Para *GAPDH* (B) las curvas de amplificación se muestran en los 4 grupos experimentales evaluados para la cuantificación de los niveles de expresión de *Gankyrin* a nivel de mRNA. En naranja: pQBI-25 + GANK S (sentido); en verde oscuro: pQBI-25 + GANK AS (antisentido); en azul: pQBI-25 (control); en verde claro: control de lipofección.

Con base en los resultados, se realizó el procesamiento de los datos para la cuantificación del nivel de expresión relativo de *Gankyrin* por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde se

observó, al compararse con el control, una amplificación 4,000 y 5,000 veces mayor, en las células transfectadas con las construcciones pQBI-25 + GANK en antisentido y sentido, respectivamente. Estos resultados fueron sometidos a análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA) y graficados en Graphpad Prism. Las células transfectadas con el vector pQBI-25 mostraron una diferencia significativa en la expresión al compararse contra células únicamente expuestas a lipofectamina (Fig. 33). No obstante, al compararse los niveles de expresión relativa de *Gankyrin* en células pQBI-25 + GANK S y pQBI-25 + GANK AS esta fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) al aumentar cerca de 4,000 y 5,000 veces la expresión de *Gankyrin* con respecto al control.

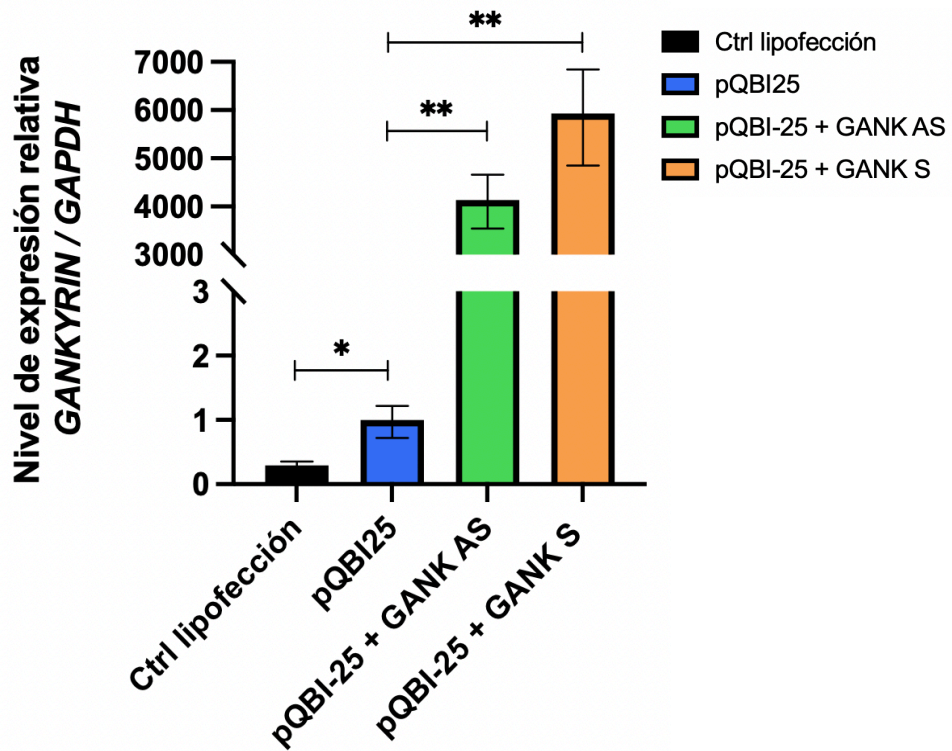


Figura 33. Cuantificación de los niveles de expresión relativos de *Gankyrin* en la línea celular 5637. El análisis por el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ demostró el aumento en la expresión a nivel transcrito en los grupos transfectados con las construcciones pQBI-25 + GANK en antisentido y sentido al compararse con el control. Los datos de los niveles de mRNA de *Gankyrin* se presentan como medias \pm DS (desviación estándar). La significancia se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con comparación múltiple de Dunnet. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Con la finalidad de contrastar los efectos de la sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin*, se realizó la extracción de proteínas a las 24 horas post-transfección. Una vez obtenidas las proteínas, se realizó un western blot como se describe en la sección de materiales y métodos. Con base en los resultados se observó el efecto de la sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin* a nivel proteína en la línea celular 5637 (Fig. 34).

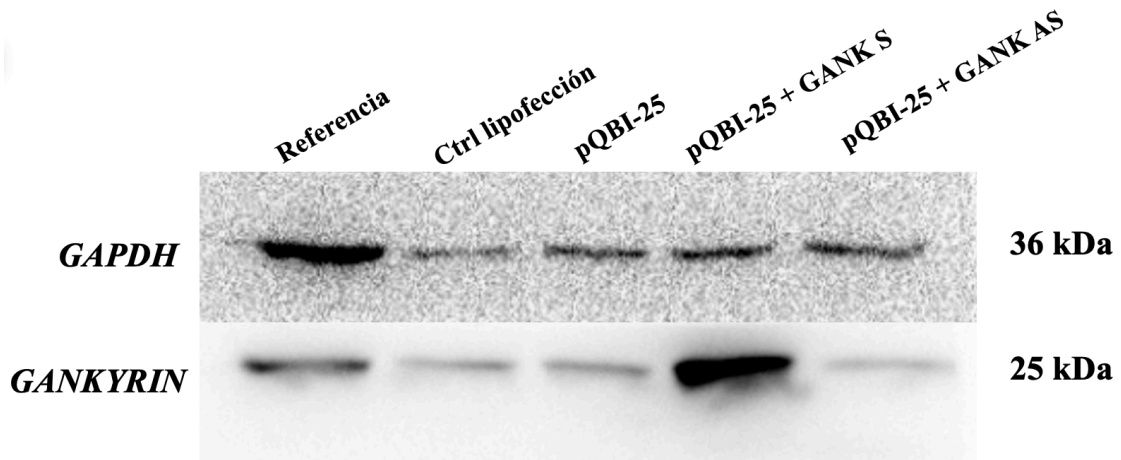


Figura 34. Inmunodetección de *Gankyrin* mediante western blot en la línea celular 5637. Se observa la presencia de señal quimioluminiscente tras 2 segundos de exposición. La membrana superior corresponde a la detección de *GAPDH* (36 kDa); la membrana inferior corresponde a *Gankyrin* (25 kDa). Como control de referencia se utilizaron células 5637 sin exposición a ADN y lipofectamina.

Posteriormente, con las imágenes obtenidas se realizó un análisis densitométrico, donde se determinó un aumento equivalente a 5 veces más la expresión de *Gankyrin* en células pQBI-25 + GANK S. Por el contrario, las células pQBI-25 + GANK AS exhibieron una reducción del 50 % en el nivel de expresión al compararse con el control (Fig. 35). La señal obtenida por parte del control endógeno (*GAPDH*) se mantuvo homogénea en todas las muestras.

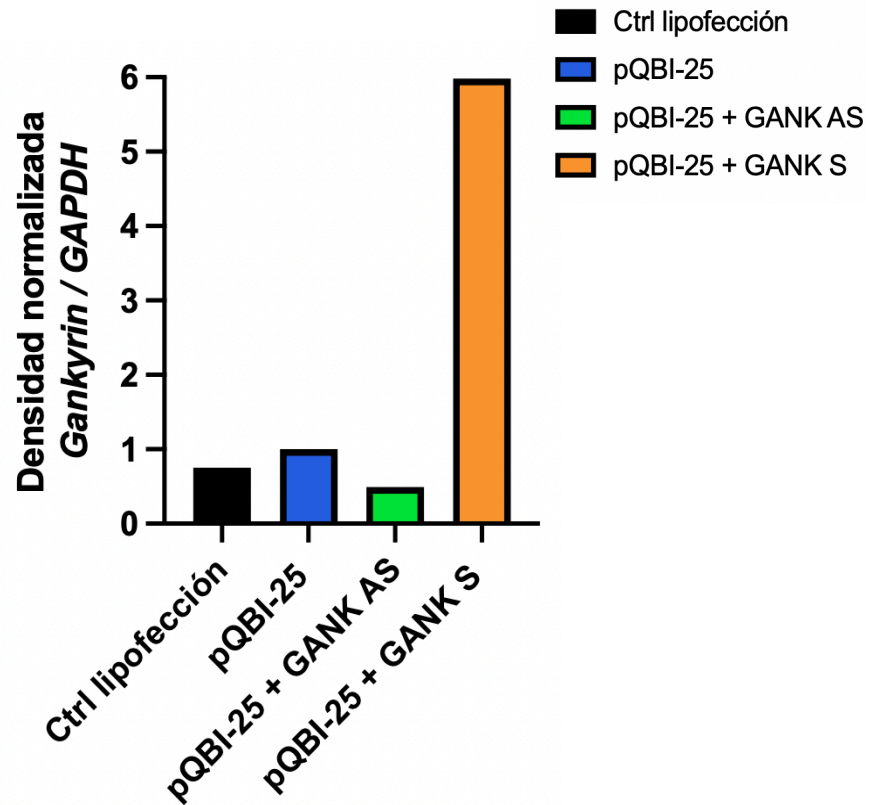


Figura 35. Análisis densitométrico de la expresión de *Gankyrin* en la línea celular 5637. Se observa la diferencia en los niveles de expresión a nivel proteína entre los 4 grupos experimentales. En comparación con el control (pQBI-25), los niveles de expresión de *Gankyrin* en las células pQBI-25 + GANK S fueron 5 veces mayor, mientras que en las células pQBI-25 + GANK AS se observó una disminución de 0.5 veces.

Una vez cuantificados los niveles de expresión de *Gankyrin* y con la finalidad de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la viabilidad y proliferación se transfectaron nuevamente células 5637 en todos los grupos experimentales a evaluar (Fig 36 A). Los resultados mostraron una diferencia significativa entre todos los grupos a los diferentes lapsos de tiempo evaluados (Fig. 36 B-E).

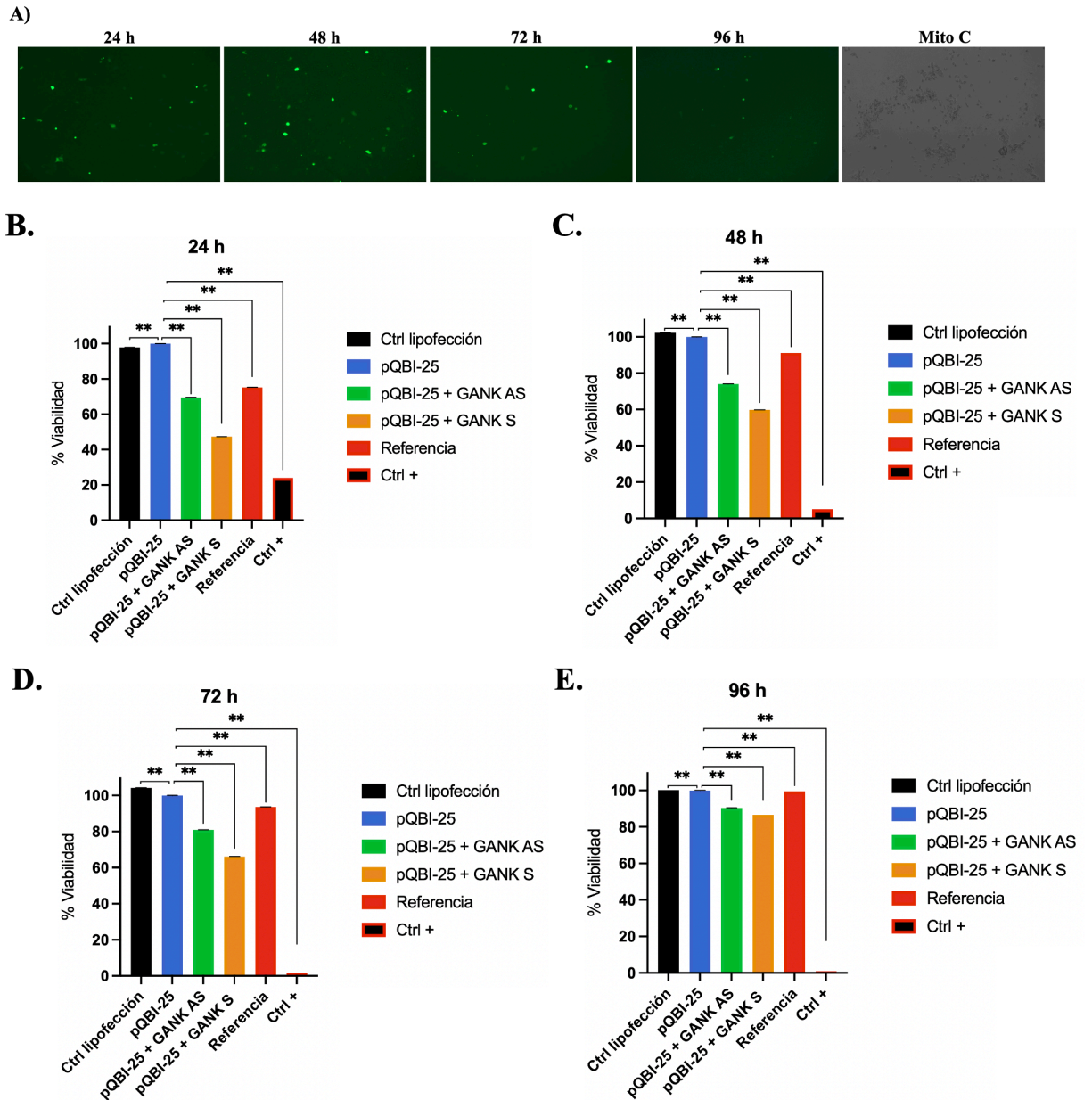


Figura 36. (A) Análisis de la expresión de *Gankyrin* sobre la viabilidad de las células 5637. Visualización por microscopía fluorescente de células 5637 transfectadas con el vector pQBI-25 (control) para el monitoreo de la permanencia del vector mediante captación de señal verde fluorescente (GFP). Adicionalmente se observan los cambios en la morfología celular producto del tratamiento con mitomicina a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células 5637. **(B-E) Viabilidad de células 5637 con sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin*.** Mediciones de absorbancia a longitudes de onda de 570 y 600 nm a las 24 **(B)**, 48 **(C)**, 72 **(D)** y 96 horas **(E)**. Los datos se presentan como porcentaje de viabilidad \pm DS (desviación estándar). La significancia se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con comparación múltiple de Dunnet. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

La sobreexpresión de *Gankyrin* redujo la viabilidad, mientras que, en el caso del crecimiento normalizado, las células con el vector de sobreexpresión mostraron un incremento altamente significativo en comparación con el control en el lapso comprendido de las 24 a las 96 horas (Fig. 37). Asimismo, se observó una diferencia altamente significativa en el control tratado con Mitomicina C.

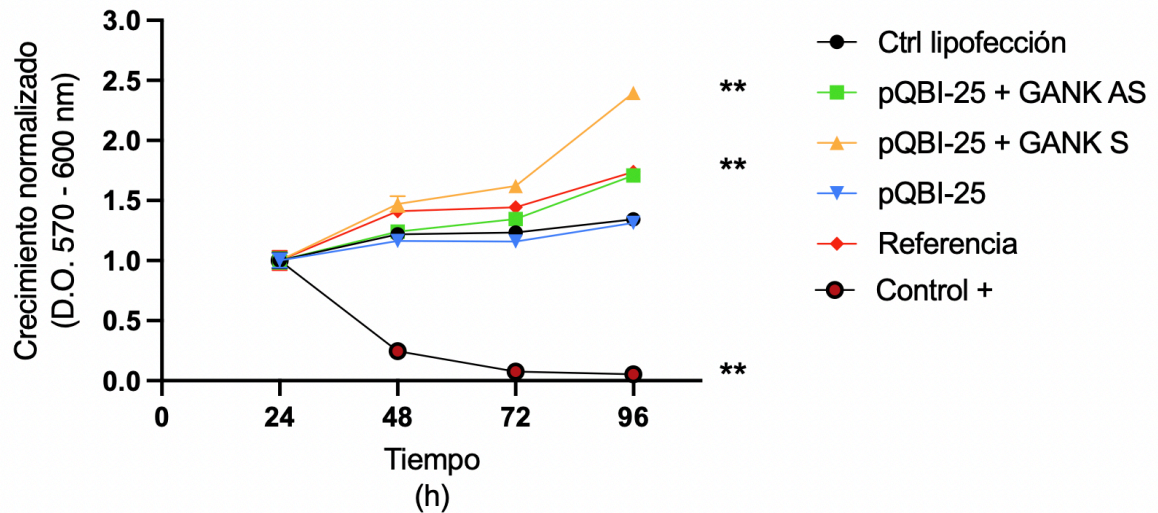


Figura 37. Análisis de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la proliferación de las células 5637. Se observa el crecimiento normalizado de cada uno de los grupos experimentales y controles. Desde las 24 y hasta las 96 horas, se observa una diferencia altamente significativa en el crecimiento de las células con sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin* en comparación con el control. Estas observaciones contrastan con la ausencia de crecimiento por parte de las células tratadas con Mitomicina C. La significancia se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con comparación múltiple de Dunnet. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la motilidad celular, las células transfectadas fueron sometidas al protocolo de lesión en monocapa y se mantuvieron en condiciones de privación de suero fetal. La toma de fotografías se realizó una vez practicada la lesión y añadido el medio de privación (hora 0), posteriormente se continuó con el registro fotográfico a las 24 y 48 horas posteriores al ensayo (Fig. 38).

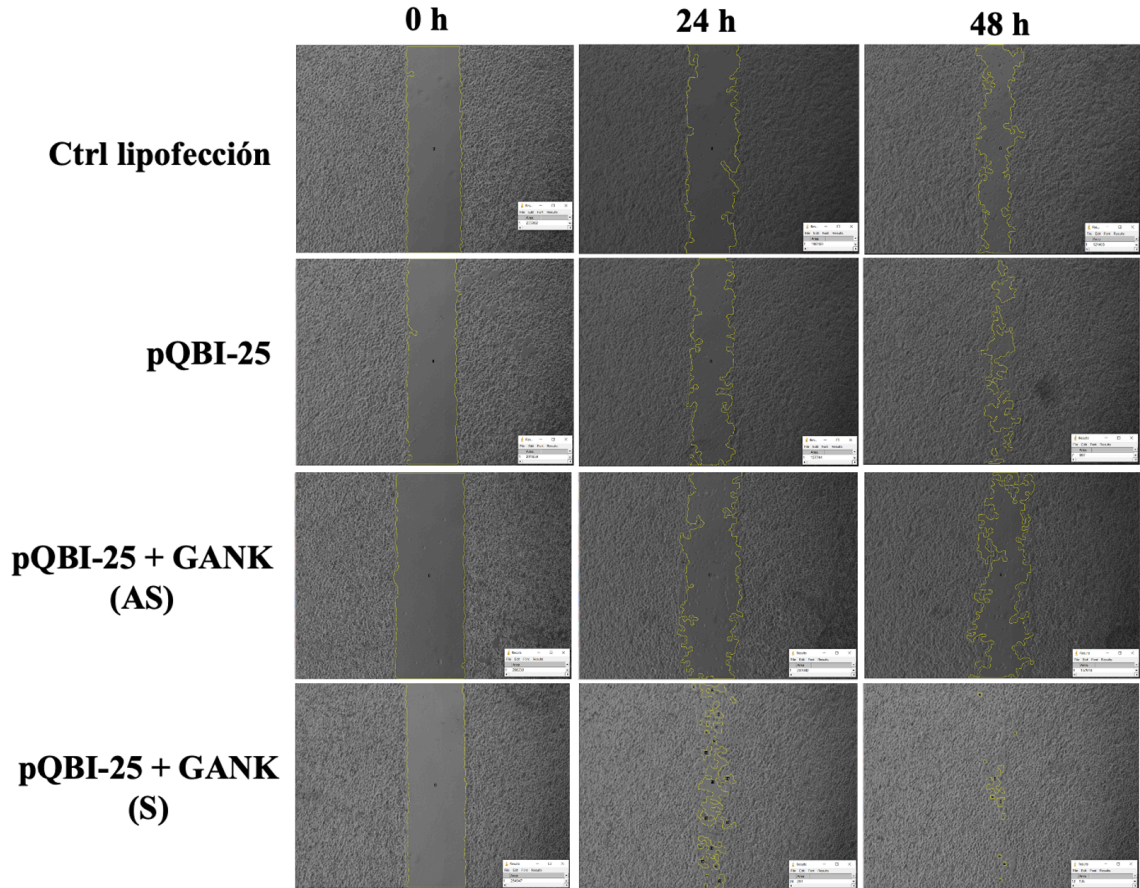


Figura 38. Análisis del efecto de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la migración de las células 5637. Imágenes representativas del cierre de lesión y procesamiento de imágenes en Image J. Se observa el potencial migratorio de las células pQBI-25 + GANK S y pQBI-25 + GANK AS a las 0, 24 y 48 horas. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector pQBI-25 sin inserto y células expuestas a lipofectamina. A las 24 y 48 horas, los controles muestran un comportamiento similar. Sin embargo, las células con sobreexpresión de *Gankyrin* exhiben un mayor potencial de migración que comprende de las 24 a las 48 horas, donde la herida es casi imperceptible. Referente a las células con inhibición de *Gankyrin*, se observa un menor potencial de migración incluso a las 48 horas con respecto al control.

Con base en las observaciones y el procesamiento de las imágenes en Image J para el cálculo del área de lesión, se determinó que tanto las células expuestas a lipofectamina, como las células transfectadas con el vector pQBI-25, mostraron un comportamiento similar en todos los lapsos de tiempo evaluados. No obstante, el grupo de células con sobreexpresión de *Gankyrin*, mostró un porcentaje de cierre de lesión significativamente mayor que el control a las 24 y 48 horas. Por su parte, esta diferencia en el porcentaje de

cierre fue significativamente menor en las células con inhibición de *Gankyrin* a las 48 horas (Fig. 39).

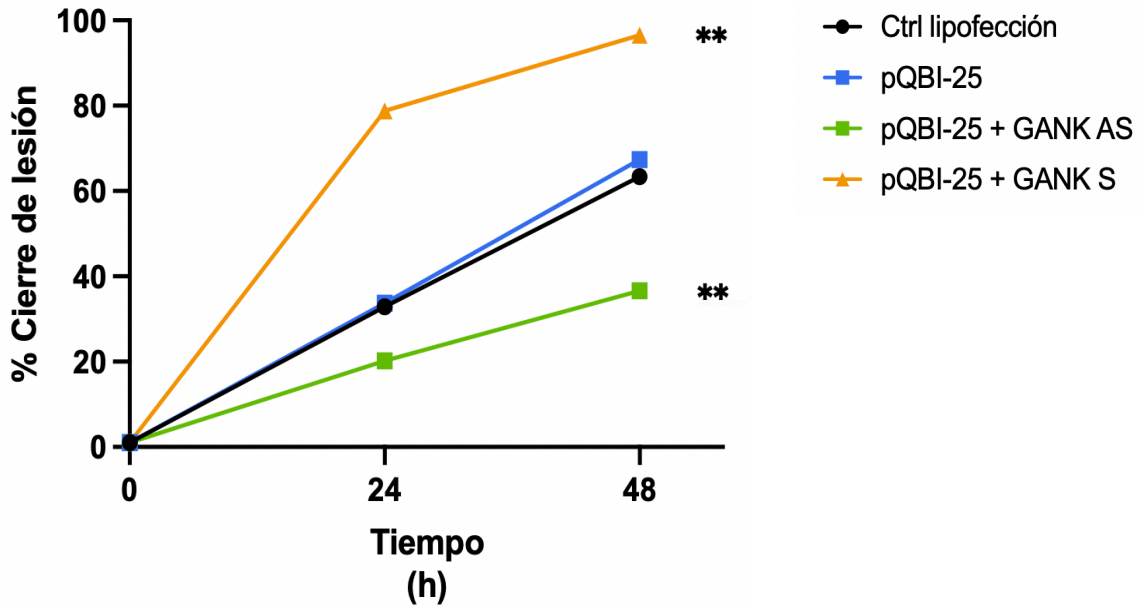


Figura 39. Análisis de la sobreexpresión de *Gankyrin* sobre la migración de las células 5637. Se observa el potencial migratorio de las células transfectadas con la construcción pQBI-25 + GANK sentido y pQBI-25 + GANK antisentido a las 0, 24 y 48 horas. Los grupos control, exhibieron un comportamiento similar en el periodo de tiempo a evaluar. No obstante, se observan diferencias significativas a las 24 y horas 48 horas en las células con sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin*. Los datos se presentan como media \pm DS (desviación estándar). La significancia se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías

DISCUSIÓN

Gankyrin, denominado igualmente *PSMD10* o *p28* es una proteína de 226 aminoácidos compuesta por siete repeticiones de ankyrina. Es una subunidad del proteosoma 26S que interactúa específicamente con la ATPasa S6b del regulador 19S (Mosavi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; DeCS, 2017; String 2022). Se encuentra altamente conservada evolutivamente y en humanos está localizada en el cromosoma Xq22.3. Estudios recientes, han correlacionado la expresión modificada de *Gankyrin* como un factor importante en la tumorigénesis y metástasis; así como un factor de mal pronóstico en distintos tipos de cáncer (Jing *et al.*, 2014; Zamani *et al.*, 2018; Kashyap *et al.*, 2022); sugiriendo un potencial como blanco diagnóstico y terapéutico. Sin embargo, no existen reportes sobre las funciones fisiológicas y patológicas de *Gankyrin* en cáncer de vejiga. Por lo que a fin de establecer un abordaje de ganancia y pérdida de función (Ortíz *et al.*, 2008; Prelich, 2012) que permitiera ampliar el entendimiento sobre las implicaciones funcionales de *Gankyrin* en células de cáncer de vejiga, la línea celular 5637 se transfectó con vectores plasmídicos para la sobreexpresión y silenciamiento de *Gankyrin*. Con este acercamiento demostramos que la sobreexpresión de *Gankyrin* eleva la viabilidad, proliferación y migración de las células 5637, mientras que el efecto contrario se observa con las células transfectadas con el vector de inhibición de *Gankyrin*.

Otros autores han empleado este tipo de estrategias en donde se ha determinado la función de *Gankyrin* sobre la promoción del crecimiento tumoral y metástasis en cáncer de mama (Zhen *et al.*, 2013), colangiocarcinoma (Zheng *et al.*, 2014), carcinoma de células escamosas esofágicas (Ortíz *et al.*, 2008), entre otros. Así como sobre la modulación del metabolismo energético implicado en la progresión del carcinoma de células pequeñas de pulmón (Yu *et al.*, 2022). El presente trabajo, mostró el efecto de la sobreexpresión y del silenciamiento de *Gankyrin* sobre la viabilidad, proliferación y migración en un modelo celular de cáncer de vejiga.

A nivel de mRNA, el nivel de expresión relativo de *Gankyrin* fue significativamente mayor en las células pQBI-25 + GANK S y pQBI-25 + GANK AS en comparación con el control transfectado con el vector vacío, esto a consecuencia del aumento en la cantidad de transcrito. Es importante mencionar que en las células control, se observó un aumento en el nivel de expresión al compararse contra células únicamente expuestas a lipofectamina. Estas diferencias han sido descritas como parte de los efectos “off target” inducidos por el uso de vectores con promotores fuertes, genes reporteros y otros elementos que pueden promover un estado de estrés y desequilibrio en la célula, derivando en la alteración de los programas de transcripción (Kinoshita *et al.*, 2008; Stepanenko y Heng, 2017). Por su parte, el análisis de expresión proteica mostró un nivel de expresión 5 veces mayor en las células pQBI-25 + GANK S. En las células pQBI-25 + GANK AS la expresión disminuyó 0.5 veces en comparación con el control. Estos resultados permitieron la discriminación y contraste de los niveles de expresión de mRNA y proteína. Además de validar los efectos de la expresión ectópica de *Gankyrin* en una línea celular (Higashitsuji *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2022).

Abordando el efecto de *Gankyrin* sobre la viabilidad de las células 5637, se determinó un porcentaje de viabilidad del 47 % en células pQBI-25 + GANK S a las 24 h en comparación con el control de células transfectadas con el vector vacío (100 %). No obstante, el porcentaje de células viables incrementó a las 48, 72 y 96 horas a un total del 58 %, 66 % y 87 % respectivamente. En las células pQBI-25 + GANK AS el porcentaje de viabilidad inicial (24 h) fue del 70 % con un aumento progresivo al 90 %. Yu *et al.*, (2022) reportaron un incremento en la viabilidad y proliferación en células con sobreexpresión de *Gankyrin* a las 48 horas posteriores a la transfección. Por el contrario, Zheng *et al.*, (2014) observaron una reducción en la viabilidad producto del silenciamiento de *Gankyrin*. Estos resultados sugieren que tanto la sobreexpresión como la inhibición de *Gankyrin* afectan de forma negativa la viabilidad en comparación con las células con el vector pQBI-25 vacío a las 24 horas. No obstante, la sobreexpresión de proteínas puede resultar por sí sola en la inhibición del crecimiento celular y citotoxicidad; Moriya (2015), refiere a la sobrecarga de recursos, el desbalance estequiométrico, las interacciones

aleatorias y la modulación de las vías de señalización como los principales mecanismos que propician los defectos del crecimiento y la citotoxicidad. Sin embargo, la forma en la que la sobreexpresión puede provocar efectos en la célula, depende de las propiedades y funciones de la proteína (Prelich, 2012). Considerando las propiedades e implicaciones funcionales de *Gankyrin* (Man *et al.*, 2010; Li y Guo, 2010; Kanabar y Muth, 2020; Kashyap *et al.*, 2022), estas hipótesis podrían explicar el efecto observado sobre la viabilidad celular. No obstante, también se observó un aumento progresivo en el porcentaje de viabilidad con respecto al tiempo; sugiriendo la adaptación de las células a medida que los niveles de expresión disminuían, permitiendo compensar el efecto de la sobrecarga proteica (Abruzzi *et al.*, 2002; Kitano, 2004; Li *et al.*, 2014; Moriya, 2015 y Prelich, 2012).

Sumando a la evidencia, las células pQBI-25 + GANK S mostraron el mayor índice de crecimiento con respecto al control, siendo este significativo a las 48, 72 y 96 horas; sugiriendo que la sobreexpresión de *Gankyrin* ejerce un efecto positivo sobre la proliferación celular. Estos resultados coinciden con lo reportado por Yu *et al.*, (2022) quienes observaron un incremento significativo en el número de células producto de la sobreexpresión de *Gankyrin* en células A549 y H460. Por el contrario, Zheng *et al.*, (2014) y Camacho-Moll *et al.*, (2019) reportaron que la inhibición de *Gankyrin* suprime la proliferación y conduce al arresto celular en modelos de colangiocarcinoma y células NTERA2. En células pQBI-25 + GANK AS no se observó un efecto sobre el crecimiento celular a las 48 horas con respecto al control. Contrariamente, se observó un aumento significativo en el índice de proliferación en el periodo comprendido de las 72 y 96 horas. No obstante, este crecimiento se mantuvo por debajo del observado en las células pQBI-25 + GANK S. En conjunto, estos resultados sugieren que tanto la sobreexpresión como la inhibición de *Gankyrin* tienen un efecto sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular 5637. Diversos estudios han revelado nuevas clases de oncogenes involucrados en el mantenimiento tumoral (Pagliarini *et al.*, 2015). La activación de mutaciones en otros componentes de las vías de señalización inducidas por el oncogén, son favorecidas por la inhibición del oncogén y ocurren a través de la inducción de factores de crecimiento y la señalización mediada por RAS (Poulikakos *et al.*, 2010); re-estableciendo las vías de

señalización originales (Poulikakos *et al.*, 2010; Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Van Allen *et al.*, 2014). Adicionalmente, las variaciones en la proporción respuesta-resistencia producto de la inhibición del oncogén (Sharma *et al.*, 2006; Sharma y Settleman, 2010; Stegmeier *et al.*, 2010) son atribuidas a la diferencia en la activación e inactivación de proteínas de señalización que regulan las señales pro-supervivencia y pro-apoptóticas (Sharma *et al.*, 2006). Sugiriendo que el rango de transactivación de estos mecanismos de retroalimentación hace un sutil discernimiento entre el “shock” oncogénico y la activación de mecanismos de resistencia en distintos tipos de cáncer. Dentro de estos procesos, se han reportado como rutas clave en la regulación, las vías MAPK y PI3K-AKT; descritas dentro de las vías de interacción con *Gankyrin* (Man *et al.*, 2010; Li y Guo, 2010; Kanabar y Muth, 2020). Pudiendo atribuirse a este fenómeno, las diferencias observadas en el comportamiento de las células transfectadas para la sobreexpresión y silenciamiento de *Gankyrin*. No obstante, es necesario realizar ensayos complementarios para una determinación concluyente sobre el efecto de *Gankyrin* sobre la proliferación de la línea celular 5637.

Referente al potencial migratorio de las células pQBI-25 + GANK S; se observó una mayor motilidad aunado a un porcentaje de cierre de lesión significativamente mayor a las 24 (78.79 %) y 48 horas (96.52 %) con respecto al control (33.73 % y 67.41 % respectivamente). Por el contrario, en células pQBI-25 + GANK AS se observó una disminución de la motilidad celular a las 24 y 48 horas. Esta reducción se vió reflejada de forma significativa a las 48 horas, en un menor porcentaje de cierre de lesión (36.61 %) con respecto al control (67.41 %) y las células con sobreexpresión de *Gankyrin* (96.52 %). Considerando las posibles variaciones entre los porcentajes de migración en función de las líneas celulares analizadas, estas observaciones coinciden con los efectos reportados en la motilidad celular producto de la sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin* en distintas líneas celulares (Ortíz *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011; Zhen *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2022). A pesar de esto, el mecanismo molecular a través del cual *Gankyrin* promueve la migración celular y metástasis permanece sin esclarecerse; siendo algunas de las posibilidades, la activación de las vías PI3K/AKT, IL-6/STAT3 y Wnt/ β -catenina; modificando la dinámica del citoesqueleto y la expresión de moléculas de adhesión y otros

marcadores de migración e invasión (Sun *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Algunas moléculas intermediarias en estas vías de señalización han sido propuestas como marcadores de invasión en cáncer de vejiga (Gontero *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2020; Tsai *et al.*, 2023). Por lo que será de creciente interés, evaluar el perfil de expresión de estos marcadores y su relación con los niveles de expresión de *Gankyrin*. En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de expresión de *Gankyrin* afectan la viabilidad, proliferación y migración de las células 5637 de carcinoma urotelial.

CONCLUSIÓN

En conclusión, la sobreexpresión de *Gankyrin* afecta positivamente la viabilidad y proliferación de la línea celular 5637 de carcinoma urotelial. Además de aumentar la motilidad celular. La inhibición de *Gankyrin* por medio de un vector antisentido, redujo en un principio la viabilidad y proliferación de la línea celular 5637. No obstante, este efecto disminuyó en función del tiempo. Asimismo, la inhibición de *Gankyrin* redujo de forma significativa el potencial migratorio de las células 5637.

En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de expresión de *Gankyrin* afectan la viabilidad, proliferación y migración de las células 5637 de carcinoma urotelial.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la fase del ciclo celular en la que yacen las células posteriores a la sobreexpresión e inhibición de *Gankyrin*.
- Evaluar el estado de activación de moléculas de interacción con *Gankyrin* implicadas en los procesos de proliferación y migración celular asociados al cáncer de vejiga.
- Evaluar el perfil de expresión de *Gankyrin* en otras líneas celulares y muestras de tejido provenientes de distintos estadios de cáncer de vejiga.

BIBLIOGRAFÍA

Abruzzi, K. C., Smith, A., Chen, W., & Solomon, F. (2002). Protection from free β -tubulin by the β -tubulin binding protein Rbl2p. *Molecular and cellular biology*, 22(1), 138-147.

Al-Zalabani, A. H., Stewart, K. F., Wesselius, A., Schols, A. M., & Zeegers, M. P. (2016). Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *European journal of epidemiology*, 31, 811-851.

Aldousari, S., & Kassouf, W. (2010). Update on the management of non-muscle invasive bladder cancer. *Canadian Urological Association Journal*, 4(1), 56.

American Cancer Society. 2021. Terapia intravesical para el cáncer de vejiga. [Online]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/tratamiento/terapia-intravesical.html>

Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Znaor, A., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *European urology*, 71(1), 96-108.

Bai, Z., Tai, Y., Li, W., Zhen, C., Gu, W., Jian, Z., ... & Zhou, T. (2013). Gankyrin activates IL-8 to promote hepatic metastasis of colorectal cancer. *Cancer research*, 73(14), 4548-4558.

Battista Di Pierro, G., Gulia, C., Cristini, C., Fraietta, G., Marini, L., Grande, P., ... & Piergentili, R. (2012). Bladder cancer: a simple model becomes complex. *Current genomics*, 13(5), 395-415.

Brooks, C. L., & Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular cell*, 21(3), 307-315.

Camacho Moll, M. E. (2017). Germ cell neoplasia in situ (GCNIS) and the pathogenesis of testicular germ cell cancer.

Camacho-Moll, M. E., Macdonald, J., Looijenga, L. H. J., Rimmer, M. P., Donat, R., Marwick, J. A., ... & Mitchell, R. T. (2019). The oncogene Gankyrin is expressed in testicular cancer and contributes to cisplatin sensitivity in embryonal carcinoma cells. *BMC cancer*, 19, 1-14.

Chen, Y., Li, H. H., Fu, J., Wang, X. F., Ren, Y. B., Dong, L. W., ... & Wang, H. Y. (2007). Oncoprotein p28GANK binds to RelA and retains NF- κ B in the cytoplasm through nuclear export. *Cell research*, 17(12), 1020-1029.

Clark, P. E., Agarwal, N., Biagioli, M. C., Eisenberger, M. A., Greenberg, R. E., Herr, H. W., ... & Ho, M. (2013). Bladder cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(4), 446-475.

Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., & Kost, T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 127-132.

Dawson, S., Apcher, S., Mee, M., Mayer, R. J., Higashitsuji, H., Baker, R., ... & Fujita, J. (2002). Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 10893-10902.

Dawson, S., Higashitsuji, H., Wilkinson, A. J., Fujita, J., & Mayer, R. J. (2006). Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends in cell biology*, 16(5), 229-233.

DeGeorge, K. C., Holt, H. R., & Hodges, S. C. (2017). Bladder cancer: diagnosis and treatment. *American family physician*, 96(8), 507-514.

Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS (2017). Sao Paulo (SP): BIREME / OPS / OMS. 2017 [Online]. Disponible en: <http://decs.bvsalud.org/E/homepagee.htm>

Dong, L. W., Yang, G. Z., Pan, Y. F., Chen, Y., Tan, Y. X., Dai, R. Y., ... & Wang, H. Y. (2011). The oncoprotein p28GANK establishes a positive feedback loop in β -catenin signaling. *Cell research*, 21(8), 1248-1261.

Fankhauser, C. D., & Mostafid, H. (2018). Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: nutrition and lifestyle. *Current opinion in urology*, 28(1), 88-92.

Fu, J., Chen, Y., Cao, J., Luo, T., Qian, Y. W., Yang, W., ... & Wang, H. Y. (2011). p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 α pathways. *Hepatology*, 53(1), 181-192.

Fu, X. Y., Wang, H. Y., Tan, L., Liu, S. Q., Cao, H. F., & Wu, M. C. (2002). Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World journal of gastroenterology*, 8(4), 638.

Galsky, M. D., & Hall, S. J. (2010). Bladder cancer: current management and opportunities for a personalized approach. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(6), 587-596.

Gao, L., Xie, H., Dong, L., Zou, J., Fu, J., Gao, X., ... & Song, H. (2014). Gankyrin is essential for hypoxia enhanced metastatic potential in breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 9(3), 1032-1036.

García-Torres, I., Cervantes-López, M., Ortega-Arellano, A., & Enríquez-Flores, S. L. V. G. (2020). Proteínas con repeticiones de anquirina: estructura, función y retos bioquímicos. *Proteins*, 14(15), 16.

Gellhaus, P. 2020. Urine tumor markers in bladder cancer diagnosis overview of urine tumor markers. *Medscape*. [Online] Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/1953022-overview#a1>

Georg, J., & Hess, W. R. (2011). cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 286-300.

GLOBOCAN. 2022. World Health Organization. [Online] Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online>

Gontero, P., Banisadr, S., Frea, B., & Brausi, M. (2004). Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *European urology*, 46(3), 296-311.

Guo, X., Piao, H., Xue, Y., Liu, Y., & Zhao, H. (2020). LMX1B-associated gankyrin expression predicts poor prognosis in glioma patients. *Journal of International Medical Research*, 48(9), 0300060520954764.

Hall, M. C., Chang, S. S., Dalbagni, G., Pruthi, R. S., Seigne, J. D., Skinner, E. C., ... & Schellhammer, P. F. (2007). Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *The Journal of urology*, 178(6), 2314-2330.

Han, Y., Jin, X., Zhou, H., & Liu, B. (2018). Identification of key genes associated with bladder cancer using gene expression profiles. *Oncology letters*, 15(1), 297-303.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., ... & Malek, S. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, 464(7287), 431-435.

Hayashi, T., Fujita, K., Hayashi, Y., Hatano, K., Kawashima, A., McConkey, D. J., & Nonomura, N. (2020). Mutational landscape and environmental effects in bladder cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6072.

He, F., Chen, H., Yang, P., Wu, Q., Zhang, T., Wang, C., ... & Cao, J. (2016). Gankyrin sustains PI3K/GSK-3 β / β -catenin signal activation and promotes colorectal cancer aggressiveness and progression. *Oncotarget*, 7(49), 81156.

Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Itoh, K., Sakurai, T., Nagao, T., Sumitomo, H., ... & Fujita, J. (2005). The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer cell*, 8(1), 75-87.

Higashitsuji, H., Higashitsuji, K., Itoh, T., Sakurai, T., Nagao, Y., Sumitomo, *et al.* *J. Biol. Chem.*, 277 (13) (2002 Mar), pp. 10893-10902.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., ... & Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature medicine*, 6(1), 96-99.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., ... & Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature medicine*, 6(1), 96-99.

Higashitsuji, H., Liu, Y., Mayer, R. J., & Fujita, J. (2005). The oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation. *Cell cycle*, 4(10), 1335-1337.

Hwang, J. A., Yang, H. M., Hong, D. P., Joo, S. Y., Choi, Y. L., Park, J. H., ... & Kim, S. J. (2014). Gankyrin is a predictive and oncogenic factor in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget*, 5(19), 9065.

Iwai, A., Marusawa, H., Kiuchi, T., Higashitsuji, H., Tanaka, K., Fujita, J., & Chiba, T. (2003). Role of a novel oncogenic protein, gankyrin, in hepatocyte proliferation. *Journal of gastroenterology*, 38, 751-758.

Jing, H., Zhang, G., Meng, L., Meng, Q., Mo, H., & Tai, Y. (2014). Gradually elevated expression of Gankyrin during human hepatocarcinogenesis and its clinicopathological significance. *Scientific reports*, 4(1), 5503.

Kanabar, D., & Muth, A. (2020). Exploring gankyrin's role in cancer development and its potential as a therapeutic target. *Future Medicinal Chemistry*, 12(18), 1603-1606.

Kashyap, D., Varshney, N., Parmar, H. S., & Jha, H. C. (2022). Gankyrin: At the crossroads of cancer diagnosis, disease prognosis, and development of efficient cancer therapeutics. *Advances in cancer biology-metastasis*, 4, 100023.

Kawasaki, H., Taira, K., & Morris, K. V. (2005). siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell cycle*, 4(3), 442-448.

Kim, Y. H., Kim, J. H., Choi, Y. W., Lim, S. K., Yim, H., Kang, S. Y., ... & Park, T. J. (2013). Gankyrin is frequently overexpressed in breast cancer and is associated with ErbB2 expression. *Experimental and molecular pathology*, 94(2), 360-365.

Kinoshita, A., Kobayashi, D., Hibino, Y., Isago, T., Uchino, K., Yagi, K., ... & Komada, F. (2008). Regulation of CMV promoter-driven exogenous gene expression with

doxorubicin in genetically modified cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(12), 1659-1665.

Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 826-837.

Kiyoshima, K., Akitake, M., Shiota, M., Takeuchi, A., Takahashi, R., Inokuchi, J., ... & Eto, M. (2016). Prognostic significance of preoperative urine cytology in low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Anticancer research*, 36(2), 799-802.

Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 α -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PloS one*, 10(9), e0137466.

Kiyoshima K, Akitake M, Shiota M, Takeuchi A, Takahashi R, Inokuchi J, Tatsugami K, Yokomizo A and Eto M: Prognostic significance of preoperative urine cytology in low-grade non-muscle- invasive bladder cancer. *Anticancer Res* 36: 799-802, 2016.

Krzywda, S., Brzozowski, A. M., Higashitsuji, H., Fujita, J., Welchman, R., Dawson, S., ... & Wilkinson, A. J. (2004). The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1541-1545.

Lavery, H. J., Zaharieva, B., McFaddin, A., Heerema, N., & Pohar, K. S. (2017). A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection. *BMC cancer*, 17, 1-7.

Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C., & Weissman, J. S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, 157(3), 624-635.

Li, H., Fu, X., Chen, Y., Hong, Y., Tan, Y., Cao, H., ... & Wang, H. (2005). Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 128(7), 2029-2041.

Li, H., Zhang, J., Zhen, C., Yang, B., & Feng, L. (2018). Gankyrin as a potential target for tumor therapy: evidence and perspectives. *American journal of translational research*, 10(7), 1949.

Li, J., & Guo, Y. (2010). Gankyrin oncoprotein: structure, function, and involvement in cancer. *Current chemical biology*, 4(1), 13-19.

Li, J., & Tsai, M. D. (2002). Novel insights into the INK4-CDK4/6-Rb pathway: counter action of gankyrin against INK4 proteins regulates the CDK4-mediated phosphorylation of Rb. *Biochemistry*, 41(12), 3977-3983.

- Li, J., Knobloch, T. J., Kresty, L. A., Zhang, Z., Lang, J. C., Schuller, D. E., & Weghorst, C. M. (2011). Gankyrin, a biomarker for epithelial carcinogenesis, is overexpressed in human oral cancer. *Anticancer research*, 31(9), 2683-2692.
- Li, J., Mahajan, A., & Tsai, M. D. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein– protein interactions. *Biochemistry*, 45(51), 15168-15178.
- Li, J., Tian, F., Li, D., Chen, J., Jiang, P., Zheng, S., ... & Wang, S. (2014). MiR-605 represses PSMD10/Gankyrin and inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma cell progression. *FEBS letters*, 588(18), 3491-3500.
- Li, X., Zhang, Y., Xiong, C., Jin, H., Jing, B., Zhang, Y., & Fan, D. (2009). Overexpression of a new gene P28GANK confers multidrug resistance of gastric cancer cells. *Cancer investigation*, 27(2), 129-139.
- Liu, Y., Xu, J., Jiang, M., Ni, L., Chen, Y., & Ling, Y. (2015). Association between functional PSMD10 Rs111638916 variant regulated by MiR-505 and gastric cancer risk in a Chinese population. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3), 1010-1017.
- Liu, Y., Zhang, J., Qian, W., Dong, Y., Yang, Y., Liu, Z., ... & Wu, S. (2014). Gankyrin is frequently overexpressed in cervical high grade disease and is associated with cervical carcinogenesis and metastasis. *PLoS One*, 9(4), e95043.
- Lozano, G., & Zambetti, G. P. (2005). Gankyrin: an intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. *Cancer cell*, 8(1), 3-4.
- Luo, K. W., Lung, W. Y., Luo, X. L., & Huang, W. R. (2018). EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*, 9(15), 12261.
- Man, J. H., Liang, B., Gu, Y. X., Zhou, T., Li, A. L., Li, T., ... & Zhang, X. M. (2010). Gankyrin plays an essential role in Ras-induced tumorigenesis through regulation of the RhoA/ROCK pathway in mammalian cells. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2829-2841.
- Mayer, R. J., & Fujita, J. (2006). Gankyrin, the 26 S proteasome, the cell cycle and cancer.
- Mayorga, G. E., Ibarra, O. I., Sedano, B. J., Trujillo, O. L., Cornejo, D. V., Palmeros, R. A., ... & Pacheco, G. C. (2014). Aplicación de nomogramas en México para cáncer de vejiga en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. *Revista Mexicana de Urología*, 74(1), 3-8.
- Meng, Y., He, L., Guo, X., Tang, S., Zhao, X., Du, R., ... & Fan, D. (2010). Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer. *Cancer letters*, 297(1), 9-17.

Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., & Peng, Z. Y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science*, 13(6), 1435-1448.

Nagao, T., Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R. J., ... & Fujita, J. (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10668-10674.

Nakamura, Y., Umehara, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Padmanabhan, B., & Yokoyama, S. (2007). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the non-ATPase subunit Nas6 in complex with the ATPase subunit Rpt3 of the 26S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), 190-192.

Nargund, V. H., Tanabalan, C. K., & Kabir, M. N. (2012, October). Management of non-muscle-invasive (superficial) bladder cancer. In *Seminars in oncology* (Vol. 39, No. 5, pp. 559-572). WB Saunders.

Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A., & Vasdev, N. (2021, January). Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 39, No. 1, pp. 41-51). Elsevier.

NIH. 2023. Plasmid. National Human Genome Research Institute. [Online]. Disponible en: <http://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid>.

Ortiz, C. M., Ito, T., Tanaka, E., Tsunoda, S., Nagayama, S., Sakai, Y., ... & Shimada, Y. (2008). Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *International journal of cancer*, 122(2), 325-332.

Pagliarini, R., Shao, W., & Sellers, W. R. (2015). Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO reports*, 16(3), 280-296.

Parkin, D. M. (2008). The global burden of urinary bladder cancer. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 42(sup218), 12-20.

Peng, G., Wang, C., Wang, H., Qu, M., Dong, K., Yu, Y., ... & Gao, X. (2023). Gankyrin-mediated interaction between cancer cells and tumor-associated macrophages facilitates prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Oncoimmunology*, 12(1), 2173422.

Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., & Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, 464(7287), 427-430.

Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854.

Prikazchikova, T. A., Abakumova, T. O., Sergeeva, O. V., & Zatsepin, T. S. (2021). Design and Validation of siRNA Targeting Gankyrin in the Murine Liver. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 47(2), 441-446.

Qin, X., Wang, X., Liu, F., Morris, L. E., Wang, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). Gankyrin activates mTORC1 signaling by accelerating TSC2 degradation in colorectal cancer. *Cancer letters*, 376(1), 83-94.

Salah Fararjeh, A., Al-Khader, A., Al-Saleem, M., & Abu Qauod, R. (2021). The prognostic significance of proteasome 26S subunit, non-ATPase (PSMD) genes for bladder urothelial carcinoma patients. *Cancer Informatics*, 20, 11769351211067692.

Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., & Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-19.

SEOM. 2020. Sociedad Española de Oncología Médica. [Online]. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/vejiga?start=4>

Sharma, S. V., & Settleman, J. (2010). Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and “oncogenic shock”. *Biochemical pharmacology*, 80(5), 666-673.

Sharma, S. V., Gajowniczek, P., Way, I. P., Lee, D. Y., Jiang, J., Yuza, Y., ... & Settleman, J. (2006). A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer cell*, 10(5), 425-435.

Sharma, S., Ksheersagar, P., & Sharma, P. (2009). Diagnosis and treatment of bladder cancer. *American family physician*, 80(7), 717-723.

Shen, Z., Xue, D., Wang, K., Zhang, F., Shi, J., Jia, B., ... & Hao, L. (2022). Metformin exerts an antitumor effect by inhibiting bladder cancer cell migration and growth, and promoting apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *BMC urology*, 22(1), 79.

Shen Z, Xue D, Wang K, Zhang F, Shi J, Jia B, Yang D, Zhang Q, Zhang S, Jiang H, Luo D, Shin JH, Lim JS, Jeon BH. Pathophysiology of Bladder Cancer. In: Bladder Cancer. Elsevier Inc.; 2018. p. 33–41.

Shin, J. H., Lim, J. S., & Jeon, B. H. (2018). Pathophysiology of bladder cancer. In *Bladder Cancer* (pp. 33-41). Academic Press.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(1), 7-30.

Song, X., Wang, J., Zheng, T., Song, R., Liang, Y., Bhatta, N., ... & Liu, L. (2013). LBH589 Inhibits proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via inhibition of gankyrin/STAT3/Akt pathway. *Molecular cancer*, *12*, 1-13.

Stegmeier, F., Warmuth, M., Sellers, W. R., & Dorsch, M. (2010). Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *87*(5), 543-552.

Stepanenko, A. A., & Heng, H. H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *773*, 91-103.

String. 2022. PSMD10. [Online]. Disponible en: <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bewbZNCYj7Kr&sessionId=b2La4RI5WEg1>

Su, B., Luo, T., Zhu, J., Fu, J., Zhao, X., Chen, L., ... & Wang, H. (2015). Interleukin-1 β /Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 inflammatory signaling contributes to persistent Gankyrin activation during hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, *61*(2), 585-597.

Sun, W., Ding, J., Wu, K., Ning, B. F., Wen, W., Sun, H. Y., ... & Wang, H. Y. (2011). Gankyrin-mediated dedifferentiation facilitates the tumorigenicity of rat hepatocytes and hepatoma cells. *Hepatology*, *54*(4), 1259-1272.

Tang, S., Yang, G., Meng, Y., Du, R., Li, X., Fan, R., ... & Fan, D. (2010). Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer. *Cancer biology & therapy*, *9*(2), 88-95.

Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current protocols in molecular biology*, *106*(1), 1-16.

Thomason, M. K., & Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing?. *Annual review of genetics*, *44*(1), 167-188.

Tomoiaga, D., Bubnell, J., Herndon, L., & Feinstein, P. (2022). High rates of plasmid cotransformation in *E. coli* overturn the clonality myth and reveal colony development. *Scientific reports*, *12*(1), 11515.

Tsai, Y. C., Wang, T. Y., Hsu, C. L., Lin, W. C., Chen, J. Y., Li, J. H., ... & Su, S. F. (2023). Selective inhibition of HDAC6 promotes bladder cancer radiosensitization and mitigates the radiation-induced CXCL1 signalling. *British Journal of Cancer*, *128*(9), 1753-1764.

Van Allen, E. M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D. J., Johannessen, C. M., Goetz, E. M., ... & Schadendorf, D. (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery*, *4*(1), 94-109.

Wang, C., Li, X., Ren, L., Ma, C., Wu, M., Liang, W., ... & He, Y. (2021). Gankyrin as potential biomarker for colorectal cancer with occult liver metastases. *Frontiers in Oncology*, *11*, 656852.

Wang, C., Wang, Y., Hong, T., Cheng, B., Gan, S., Chen, L., ... & Cui, X. (2020). Blocking the autocrine regulatory loop of Gankyrin/STAT3/CCL24/CCR3 impairs the progression and pazopanib resistance of clear cell renal cell carcinoma. *Cell Death & Disease*, *11*(2), 117.

Wang, W. P., Sun, Y., Lu, Q., Zhao, J. B., Wang, X. J., Chen, Z., ... & Li, X. F. (2017). Gankyrin promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in NSCLC through forming a closed circle with IL-6/STAT3 and TGF- β /SMAD3 signaling pathway. *Oncotarget*, *8*(4), 5909.

Wang, W. P., Yan, X. L., Li, W. M., Ni, Y. F., Zhao, J. B., Lu, Q., ... & Li, X. F. (2015). Clinicopathologic features and prognostic implications of Gankyrin protein expression in non-small cell lung cancer. *Pathology-Research and Practice*, *211*(12), 939-947.

Wang, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). Gankyrin regulates cell signaling network. *Tumor Biology*, *37*(5), 5675-5682.

Witjes, J. A., Compérat, E., Cowan, N. C., De Santis, M., Gakis, G., Lebet, T., ... & Sherif, A. (2014). EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *European urology*, *65*(4), 778-792.

Wu, Q., He, F., Yang, P., Wang, C., Chen, X., Wang, Q., ... & Cao, J. (2015). Association of gankyrin protein expression in human colorectal cancer with postoperative prognosis. *Zhonghua wei Chang wai ke za zhi= Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, *18*(6), 611-615.

Xu, J. Z., Zhang, J. L., & Zhang, W. G. (2018). Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, *19*(10), 739-749.

Yang, C., Tan, Y. X., Yang, G. Z., Zhang, J., Pan, Y. F., Liu, C., ... & Wang, H. Y. (2016). Gankyrin has an antioxidative role through the feedback regulation of Nrf2 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(5), 859-875.

Youyan G, Nianzeng X, Jianzhong S. (2019). The epidemiological status of urinary malignancies in China. *Can Res.* 2019;**22**(1):67–72.

Yu, T., Liu, Y., Xue, J., Sun, X., Zhu, D., Ma, L., ... & Shan, H. (2022). Gankyrin modulated non-small cell lung cancer progression via glycolysis metabolism in a YAP1-dependent manner. *Cell Death Discovery*, *8*(1), 312.

Zamani, P., Matbou Riahi, M., Momtazi-Borojeni, A. A., & Jamialahmadi, K. (2018). Gankyrin: a novel promising therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *46*(7), 1301-1313.

Zeng, Y. C., Sun, D., Li, W. H., Zhao, J., & Xin, Y. (2017). Gankyrin promotes the proliferation of gastric cancer and is associated with chemosensitivity. *Tumor Biology*, 39(6), 1010428317704820.

Zhang, J., Yang, Y., Zhang, Z., He, Y., Liu, Z., Yu, Y., ... & Feng, Y. (2013). Gankyrin plays an essential role in estrogen-driven and GPR30-mediated endometrial carcinoma cell proliferation via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer letters*, 339(2), 279-287.

Zhao, C., Hu, X., Tong, S., Mo, M., He, W., Wang, L., & Li, Y. (2020). MEST promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion via STAT3/Twist-1-mediated EMT. *Translational Cancer Research*, 9(10), 6178.

Zhen, C., Chen, L., Zhao, Q., Liang, B., Gu, Y. X., Bai, Z. F., ... & Man, J. H. (2013). Gankyrin promotes breast cancer cell metastasis by regulating Rac1 activity. *Oncogene*, 32(29), 3452-3460.

Zheng, J. Y., Hu, H., Du, J. J., Li, X. H., & Zhao, Q. C. (2014). p28GANK is a novel marker for prognosis and therapeutic target in gastric cancer. *Molecular Biology*, 48, 84-90.

Zheng, T., Hong, X., Wang, J., Pei, T., Liang, Y., Yin, D., ... & Liu, L. (2014). Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 59(3), 935-946.