

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



TESIS DOCTORAL

RAIMUNDO CERVERA VIDAL

2018

## Tesis Doctoral

### IDENTIFICACIÓN DE TRIM29 LOCALIZADO EN LA REGIÓN CROMOSÓMICA 11q23.3 COMO BIOMARCADOR DE RESISTENCIA A DOXORUBICINA Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Programa de Doctorado en Biomedicina y  
Biotecnología

**Raimundo Cervera Vidal**

Director: Joan Climent Bataller

Co-Directora: Ana Lluch

Valencia, Marzo 2018

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**IDENTIFICACIÓN DE *TRIM29* LOCALIZADO EN LA REGIÓN  
CROMOSÓMICA 11q23.3 COMO BIOMARCADOR DE  
RESISTENCIA A DOXORUBICINA Y PROLIFERACIÓN  
CELULAR EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

**Tesis doctoral presentada por  
RAIMUNDO CERVERA VIDAL**

**Director  
Dr. JOAN CLIMENT BATALLER**

**Co-directora  
Dra. ANA LLUCH HERNÁNDEZ**

**Tutor  
Dr. GERARDO LÓPEZ RODAS**





VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria

**Dr. Joan Climent Bataller**, investigador del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA y coordinador del laboratorio de Genómica de Sistemas y Biología celular del Cáncer de Mama.

**Dra. Ana Lluch Hernández**, doctora en Medicina. Catedrática del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**Dr. Gerardo López Rodas**. Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “**Identificación de *TRIM29* localizado en la región cromosómica 11q23.3 como biomarcador de resistencia a Doxorubicina y proliferación celular en cáncer de mama triple negativo**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Raimundo Cervera Vidal, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Valencia.

Y para que conste firma/n en Valencia, a 9 de marzo de 2018.

Joan Climent Bataller

Ana Lluch Hernández

Gerardo López Rodas



“Después de todo, ¿qué es un científico entonces?  
Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una  
cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué  
es lo que sucede.”

*Jacques Yves Cousteau*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Dra. Ana Lluch por permitirme realizar la tesis doctoral en su grupo de cáncer de mama. Al Dr. Joan Climent, por mostrarme el camino de la ciencia y transmitirme todos sus conocimientos e ideas, gracias a las cuales he podido llevar a cabo la tesis doctoral durante todos estos años.

Doy las gracias también a la Dra. Gloria Ribas por acogerme en su laboratorio durante mi trabajo final de máster y ayudarme en mis primeros pasos, compartiéndolos con dos grandes investigadoras como Sara y Marta. Me gustaría dar las gracias de manera especial a Maider y María, ya que gracias a los conocimientos que aprendí de ellas durante los primeros meses en su laboratorio, me ayudaron a crecer como investigador y a poder empezar a construir un laboratorio desde cero.

Seguidamente me gustaría dar las gracias a la Dra. Pilar Eroles, por estar dispuesta a ayudar en momentos de dificultad, y a todo su gran equipo, que más que compañeros de trabajo, han pasado a ser amigos de los que me llevo momentos increíbles. Gracias a Edu, por ser el ejemplo a seguir como científico; a Sandra, a la que estaré eternamente agradecido por ese empujón final que me ha ayudado a terminar esta tesis doctoral; y a Anna, Bego, Birlipta, Iris y Paula, por ayudar en todo lo que estuviera en sus manos.

También quiero dar las gracias a todas aquellas personas que han estado en el pasado en el grupo de la Dra. Eroles, como Jenny, y aquellas personas de diferentes grupos como Alba, Carla, Andreu, Lucía (señora y maestra de los Western Blot) y Marcelino, de las cuales me llevo muchos conocimientos y una gran amistad. A Guadalupe, por mostrarme el camino de la citometría, tan desconocido para mí.

Quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que han pasado por el laboratorio, ya que de todas ellas he podido aprender algo: David,

Chiri, Carles, Kiko, Estef, Pedro, Marta, Alba y Paola. No podía olvidarme de dar las gracias, por enseñarme tanto de la vida y de ciencia, a los dos valientes que empezaron conmigo el camino de la investigación, como son Alberto y Jaume. También quiero dar las gracias a los actuales integrantes del barco que no se hunde, ya que gracias al esfuerzo de todos sigue a flote hoy en día, y podemos seguir tocando... Roberto, Raúl y Quico, os deseo el mejor y más fructífero de los futuros. Finalmente quiero dar las gracias a Carlos, compañero y amigo en este duro viaje, con tantos momentos de nervios, euforia, enfados y alegrías compartidos. Su apoyo constante y la enseñanza de múltiples técnicas ha sido clave durante la realización de la tesis doctoral.

Todas las gracias que intente dar a mi familia van a quedarse cortas. Mamá y Papá, gracias por vuestro apoyo incondicional en todo momento y por aguantar los momentos de nervios, histeria, resignación, enfado e intentar animarme. Gracias por creer siempre en mí, por concederme una beca predoctoral particular, y por demostrarme que luchando duro y trabajando de sol a sol se pueden conseguir aquellas cosas que en muchos momentos parece que vayan a ser imposibles. Muchas gracias a mi hermana Inés y a Antonio, ya que veo en ellos mi ejemplo a seguir en la vida. Gracias *teta* por ayudarme en todo el largo camino desde el inicio del instituto hasta el mismo fin de la tesis; sin tu ayuda sería impensable que hubiera podido llegar donde estoy ahora.

Para terminar, quiero dar las gracias a esa persona que me ha acompañado durante este duro, pero bonito camino. Gracias Isabel por tu incansable paciencia. Tu apoyo incondicional en todo momento me ha ayudado a seguir adelante, haciendo frente a cualquier adversidad. Sin ti absolutamente nada de lo que hay hecho a continuación hubiera sido posible.

## RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea en la que los pacientes pueden presentar síntomas similares y padecer la misma enfermedad por razones genéticas completamente diferentes. Los factores que contribuyen a esta heterogeneidad incluyen la variación en el genoma de cada paciente, las diferencias en el origen y la naturaleza de la célula tumoral y los eventos genéticos que contribuyen a la progresión del tumor. La recaída en cáncer de mama es una de las mayores causas de morbilidad en pacientes que desarrollan la enfermedad y, entre ellas, un 15-20% poseerán tumores de mama triple negativo (TN). La mortalidad en pacientes con cáncer de mama TN es considerablemente mayor si se compara con otros tumores mamarios, siendo complicado predecir respuestas individuales al tratamiento. Estos datos resaltan la necesidad de nuevas estrategias que integren información tanto clínica, como genética y molecular para poder predecir respuestas individuales a fármacos o la progresión de la enfermedad. En la presente tesis doctoral se ha realizado el estudio del estado genómico de la región 11q23.3 y se ha identificado el gen *TRIM29*, presente en dicha región. Se han estudiado las alteraciones presentes en dicha región cromosómica, la función de *TRIM29* en líneas celulares de cáncer de mama, su relación en la proliferación, migración y la resistencia a tratamientos mediante Doxorubicina.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos realizamos diferentes experimentos basados en técnicas de biología molecular, celular y técnicas bioinformáticas. Para la hibridación mediante Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), se elaboraron sondas no comerciales a partir del marcaje de Cromosomas Artificiales Bacterianos (BACs), con la finalidad de visualizar el estado de la región genómica de interés. De un stock de 59 líneas celulares, obtuvimos DNA, RNA, y proteína, con el fin de estudiar el estado de la región génica y la expresión de *TRIM29* a nivel de mensajero y proteína. Se seleccionaron las líneas celulares con diferente expresión de *TRIM29* y se

modificó su expresión con la finalidad de estudiar los efectos tanto a nivel funcional como para observar si variaba la co-expresión con genes relacionados positivamente. Por último, a nivel celular, estudiamos las diferencias en migración, proliferación y resistencia frente a los tratamientos, entre las líneas control y las modificadas. Además, se elaboraron *Tissue Microarray* (TMAs) de parafinas de 97 tumores de cáncer de mama para comprobar los niveles de expresión de TRIM29 en los diferentes subtipos gracias a los marcadores de clasificación estudiados en pacientes.

**Palabras clave:**

Cáncer de Mama, Triple Negativo, Líneas celulares, FISH, Doxorubicina, Apoptosis, Proliferación, Migración, Deleción, Ganancia, Metilación.

## SUMMARY

Breast cancer is a complex and heterogeneous disease where the patients present the same symptoms and suffer the same disease, but due to different genetic reasons. Some factors that contribute to this heterogeneity include patient genome variation, differences between the origin and the nature of the tumoral cell, and tumor progression due to genomic changes. Breast cancer recurrence is one of the biggest morbidity causes in patients that suffer the disease, and 15-20% of them will develop triple negative breast cancer tumors (TN). Comparing it with other tumor subtypes, the mortality of patients harbouring TN tumors is higher, in part, due to the difficulty of getting personalized drugs. These data show the need to look for new drug strategy, where clinical, genetics and molecular data could be integrated and compared. The main objective in this Thesis is to analyze the genomic status of 11q23.3 chromosomal region and the gene *TRIM29* that mapped at this region as a candidate biomarker of breast cancer proliferation and aggressiveness but also as a of therapeutic response both in breast cancer cell lines and patients.

To accomplish the objectives proposed, we will perform different experiments based in molecular biology, cellular and bioinformatic techniques. In order to perform the fluorescence in situ hybridization (FISH), non-commercial probes were done by using labelled BACs. Starting from samples of DNA, RNA and protein of 59 cell lines, we will study the status of *TRIM29* region and *TRIM29* mRNA and protein expression level. Moreover, we have 600 DNA breast cancer patients and controls collection, where we will be able to study alterations in *TRIM29* region, and we will try to relate the gain or the deletion with the different subtypes of breast cancer. Besides, Tissue Microarray (TMA) of 97 breast cancer patients will be used to observe the expression of *TRIM29* in the different subtypes according to the immunohistochemical subtype classification markers. Finally, to observe the biological implications of the biomarker, we will modify the expression of *TRIM29* in TN breast cancer cell lines, who do not express the gene, but also

in those who overexpress it. Once we get modified cell lines, we will study the differences in *TRIM29* and related genes expression, migration, proliferation and drug treatment resistance between control and modified cell lines.

**Keywords:**

Breast cancer, Triple Negative, Cell lines, FISH, Doxorubicin, Apoptosis, Proliferation, Migration, Deletion, Gain, Methylation

# *I. Índice*



<b>I. ÍNDICE</b> .....	<b>13</b>
<b>II. GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
1.1. Historia del cáncer.....	29
1.2. Cáncer.....	31
1.3. Biología del cáncer de mama.....	32
1.3.1. Clasificación histológica de los carcinomas mamarios.....	34
1.3.2. Incidencia y mortalidad.....	35
1.3.2.1. Incidencia y factores de riesgo.....	36
1.3.2.2. Mortalidad.....	36
1.3.3. ¿Qué causa su aparición?.....	37
1.3.4. Clasificación.....	39
1.3.4.1. Pronóstico tumoral.....	39
1.3.4.2. Fenotipo molecular.....	40
1.3.4.3. Genes intrínsecos.....	41
1.3.4.3.1. Luminal A.....	43
1.3.4.3.2. Luminal B.....	43
1.3.4.3.3. ERBB2+ (HER2+).....	44
1.3.4.3.4. Basal-like.....	45
1.3.4.3.5. Claudin-low.....	47
1.3.4.3.6. Normal-like.....	47
1.3.4.4. Subclasificación del Cáncer de Mama	
Triple Negativo.....	49
1.3.4.4.1. Lehman.....	49
1.3.5. Tratamientos.....	51
1.3.5.1. Quimioterapia convencional.....	51
1.3.5.2. Terapias dirigidas y resistencias al tratamiento en tumores Triple Negativo.....	53
1.4. Alteraciones genómicas en Cáncer de Mama.....	56

1.5. TRIM29 (Tripartite Motif Containing 29)/ ATDC (Ataxia Teleangiectasa Group D).....	58
1.5.1. Familia de proteínas TRIM.....	58
1.5.2. <i>TRIM29/ATDC</i> .....	59
1.5.3. Funciones.....	61
1.5.3.1. Función oncogénica.....	62
1.5.3.2. Función oncoprotectora.....	65
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
2.1. Hipótesis.....	71
2.2. Objetivos.....	72
2.2.1. Objetivos Específicos.....	72
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
3.1. Análisis de ácidos nucleicos.....	75
3.1.1. Extracción de ADN de células y tejidos.....	75
3.1.2. Extracción de plásmidos bacterianos.....	77
3.1.2.1. Extracción de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC).....	77
3.1.2.2. Extracción de plásmidos de pequeño tamaño.....	79
3.1.3. Extracción de ARN.....	80
3.1.3.1. Protocolo Trizol/Cloroformo.....	80
3.1.4. PCR convencional.....	81
3.1.4.1. Diseño de oligonucleótidos.....	81
3.1.5. Retrotranscripción de ARN a cADN.....	83
3.1.5.1. Tratamiento con DNasa I.....	83
3.1.5.2. Protocolo High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit.....	83
3.1.6. PCR cuantitativa.....	85
3.1.6.1. TaqMan.....	85
3.1.6.2. SYBR Green.....	86
3.2. Análisis de proteínas.....	88
3.2.1. Extracción de proteínas.....	88

---

3.2.2. Cuantificación proteica.....	89
3.2.3. Western Blot.....	90
3.2.4. Inmunohistoquímica.....	92
3.2.4.1. Inmunohistoquímica en líneas celulares.....	93
3.2.4.2. Diseño de bloques <i>Tissue microarray</i> (TMAs).....	94
3.2.4.3. Inmunohistoquímica de tejidos y TMAs.....	96
3.2.5. Inmunofluorescencia.....	97
3.3. Cultivo Celular.....	98
3.3.1. Líneas celulares.....	98
3.3.2. Reactivos y protocolos de cultivo.....	98
3.4. Hibridación fluorescente “in situ” (FISH).....	99
3.4.1. FISH en líneas celulares.....	99
3.4.1.1. Preparación y fijación de la muestra.....	99
3.4.1.2. Preparación de sondas no comerciales.....	100
3.4.1.2.1. Marcaje.....	101
3.4.1.2.2. Precipitación.....	102
3.4.1.3. Protocolo de hibridación.....	103
3.4.2. Pintado cromosómico.....	105
3.4.3. Visualización resultados.....	105
3.5. Modificación celular.....	106
3.5.1. Diseño y selección del pSUPER-shARN.....	106
3.5.2. Diseño y selección del pBABE-mARN.....	107
3.5.3. Clonaje del vector.....	108
3.5.4. Transformación bacteriana.....	111
3.5.5. Cultivo bacteriano.....	113
3.5.5.1. Reacciones y condiciones para el cultivo.....	113
3.5.5.2. Conservación y almacenaje.....	114
3.5.6. Ensayos de transfección.....	115
3.5.7. Ensayos de infección.....	115
3.5.8. Selección celular.....	117
3.6. Ensayos funcionales.....	118

## I. Índice

---

3.6.1. <i>Wound Healing</i> .....	118
3.6.2. Viabilidad/Proliferación celular.....	119
3.6.3. Estudio del ciclo celular.....	119
3.6.4. Apoptosis celular.....	120
3.7. Estudios de metilación.....	120
3.7.1. Modificación de ADN genómico por Bisulfito de Sodio.....	121
3.7.2. PCR específica para metilación.....	121
3.7.3. Pirosecuenciación.....	121
3.8. Hibridación genómica comparada (aCGH).....	122
3.9. Bioinformática.....	123
3.10. Análisis estadístico.....	123
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>125</b>
4.1. Delimitación de la región genómica.....	127
4.2. Estudios de <i>Copy Number Variation</i> en líneas celulares y pacientes.....	131
4.2.1. Subclasificación de las líneas celulares de cáncer de mama.....	131
4.2.2. aCGH de la región 11q23.3 en líneas celulares.....	132
4.2.3. <i>Copy Number Variation</i> de <i>TRIM29</i> en las líneas celulares.....	134
4.2.4. FISH de <i>TRIM29</i> en líneas celulares.....	135
4.2.4.1. Translocación de <i>TRIM29</i> en MDAMB-231.....	138
4.3. Metilación de <i>TRIM29</i> en líneas celulares.....	139
4.4. Expresión y Western Blot de <i>TRIM29</i> en líneas celulares.....	140
4.5. Caracterización de <i>TRIM29</i> en pacientes.....	144
4.5.1. <i>Copy Number Variation</i> de <i>TRIM29</i> en pacientes.....	144
4.5.2. Expresión de <i>TRIM29</i> en pacientes.....	146
4.6. Estudios funcionales en líneas celulares.....	152
4.6.1. Selección de las líneas celulares de cáncer de mama.....	152

---

4.6.2. Modificación de las líneas por el shRNA-TRIM29 y mediante cDNA-TRIM29.....	153
4.6.3. Estudios de correlación y validación de los genes relacionados con <i>TRIM29</i> .....	154
4.6.4. Análisis de los genes correlacionados con <i>TRIM29</i> en líneas celulares modificadas.....	155
4.6.4.1. Nivel de expresión de los genes correlacionados con <i>TRIM29</i> .....	155
4.6.4.2. Nivel de proteína de los genes correlacionados positivamente con TRIM29.....	157
4.6.5. Inmunohistoquímica de los genes correlacionados positivamente con <i>TRIM29</i> .....	159
4.6.6. Estudios de enriquecimiento funcional.....	163
4.6.7. Ensayos funcionales en líneas celulares de cáncer de mama modificadas.....	163
4.6.7.1. <i>Wound Healing</i> de las líneas celulares.....	164
4.6.7.2. Proliferación y ciclo celular de las líneas modificadas.....	165
4.7. Estudios de respuesta a tratamientos con antraciclinas.....	168
4.7.1. Viabilidad-proliferación de las líneas celulares.....	168
4.7.2. Apoptosis de las líneas modificadas.....	171
4.8. Resistencia a tratamientos con Doxorubicina mediante la fosforilación de $\gamma$ -H2AX y la activación de mecanismos de reparación.....	177
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>181</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>193</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>197</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>217</b>



## ***II. Glosario de Abreviaturas***



## II. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**aCGH.** *Array comparative genomic hybridization.* Hibridación genómica comparada

**ANOVA.** *Analysis of variance.* Análisis de Varianza

**ATDC.** *Ataxia-telangiectasia group D*

**BAC.** *Bacterial artificial chromosome.* Cromosoma artificial bacteriano

**BCL11a.** *B-cell CLL/Lymphoma 11a*

**BRCA1.** *Breast cancer 1*

**BRCA2.** *Breast cancer 2*

**BL1.** *Basal-like 1*

**BL2.** *Basal-like 2*

**CDH1.** *E-Cadherin*

**CDH3.** *P-Cadherin*

**DAPI.** *4',6-diamidino-2-phenylindole*

**DFS.** *Disease free survival.* Supervivencia libre de enfermedad

**EGFR.** *Epidermal growth factor receptor*

**FISH.** *Fluorescence in situ hybridization.* Hibridación fluorescente *in situ*

**FITC.** *Fluorescein isothiocyanate*

## II. Glosario de Abreviaturas

---

**GABRP.** *Gamma-Aminobutyric acid type A receptor pi subunit*

**GAPDH.** *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

**H2AX.** *H2A histone family member X*

**$\gamma$ -H2AX.** *Phosphorylated H2A histone family member X*

**HER2/NEU o ERBB2.** *Er-b2 receptor tyrosine kinase*

**IM.** *Immunomodulator*

**Ki-67.** *Antígeno ki-67*

**LAR.** *Luminal Androgen Receptor*

**M.** *Mesenchymal*

**MSL.** *Mesenchymal Stem Like*

**PCR.** *Polymerase Chain Reaction.* *Reacción en cadena de la polimerasa*

**pCR.** *Pathologic complete response.* *Respuesta patológica completa*

**PFS.** *Progesion free survival.* *Supervivencia libre de progresión*

**RP.** *Progesterone receptor.* *Receptor de progesterona*

**PROM1.** *Prominin 1*

**RE.** *Estrogen receptor.* *Receptor de estrógenos*

**RPMI 1640.** *Roswell Park Memorial Institute*

**SFRP1.** *Secreted frizzled related protein 1*

**SOSTDC1.** *Sclerostin domain containing 1*

**TMA.** *Tissue microarray.* Microarray de tejido

**TN.** *Triple negative.* Triple negativo

**TP53.** *Tumour protein p53*

**TRIM29.** *Tripartite Motif 29*

**VIM.** *Vimentin*



# ***1. Introducción***



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Historia del cáncer

El cáncer es una enfermedad que ha existido siempre en el ser humano. Diversos estudios realizados por la Universidad de Witwatersrand en Johannesburgo, hallaron evidencias de daño tumoral en un hueso del pie de un homínido o humano bípedo. Además, descubrieron también el tumor más antiguo encontrado en un fósil humano, correspondiendo con un neoplasma benigno, no cancerígeno, hallado en las vértebras de un niño de la especie *Australopithecus sediba*, de casi dos millones de años de antigüedad y procedente de una cueva sudafricana en Malapa.

Históricamente el cáncer se ha registrado desde la época del antiguo Egipto hace aproximadamente unos 4500 años. En restos humanos encontrados en la necrópolis de Gizeh (Egipto) que parecen corresponder a los años 2000 a. C., y en otras tumbas de diferentes sitios del mundo, se han encontrado huellas patológicas en huesos que solo son producidas por el cáncer. En pergaminos egipcios de Smith (1600 a. C.) y de Ebers (1500 a. C.) (**Figura 1**) se ilustran diferentes afecciones de la época, describiendo 8 casos de úlceras o tumores eliminados con el uso de un cauterio y posibles osteosarcomas, así como órganos afectados, como la piel, el estómago, el útero, el ano, la tiroides, la mama y relatos de extirpaciones quirúrgicas <sup>1,2</sup>.



Figura 1. Papiro de Ebers redactado en el antiguo Egipto en el período de 1500 a. C.

## 1. Introducción

---

El filósofo y médico de la antigua Grecia, Hipócrates (Siglo IV a. C.), describió su teoría de los cuatro humores (flema, sangre, bilis amarilla y bilis negra) en el *Corpus Hipocraticum*, donde relacionaba los excesos y desequilibrios de los humores a estados como la melancolía y su posible relación con enfermedades. En este escrito daba recomendaciones para el tratamiento de tumores mediante aceite de rosas y la extirpación quirúrgica. El uso por Hipócrates del término “carcinosis” (relativo al cangrejo) se debe a que relacionó el crecimiento anormal con el cuerpo del cangrejo. El término cáncer proviene de la palabra griega *karkinoma* equivalente a la palabra latina cáncer.

Galeno, médico griego del siglo II, recomendó la cauterización y la cirugía para los crecimientos tumorales, a los que denominó “oncosis”. Dicho término proviene de la palabra *onkos*, que significa “hinchazón”.

Hasta mediados del siglo XIX el tratamiento y diagnóstico de tumores fue elemental, basado en técnicas rudimentarias de extirpación de tumores, en las cuales los pacientes morían, la mayoría de las veces, por hemorragias o por infecciones debido a las bajas condiciones de esterilidad. A finales de dicho siglo, se fue obteniendo un conocimiento más amplio de la anatomía del cuerpo humano, consiguiendo así unas intervenciones quirúrgicas más precisas y específicas sobre las regiones deseadas para extirpar el cuerpo tumoral.

A principios del siglo XX, gracias a descubrimientos y avances en diversos campos de la ciencia como la física y la química, empezaron a ponerse en práctica tratamientos contra el cáncer que no constaban únicamente en intervenciones quirúrgicas. Los rayos X descubiertos por Röntgen en 1895, así como el descubrimiento, detección y aislamiento del radio por Marie Curie en 1911, permitieron el tratamiento de tumores mediante radiación. Fármacos inspirados en el gas mostaza empleados en la primera guerra mundial, fueron usados para linfomas, y otros fármacos llamados antifolatos fueron utilizados en leucemias y tumores placentarios. Más tarde aparecieron fármacos basados en el platino, antraciclina, y taxanos, los cuales tenían un efecto sobre todo el organismo sin especificidad alguna. Además, el conocimiento del cáncer de

mama se fue profundizando, encontrando que la enfermedad no era local, sino sistémica, ya que los cuerpos tumorales podían desplazarse a ganglios linfáticos cercanos al tumor, propagando así la enfermedad. A mediados y finales del siglo XX, y gracias a la descripción por Watson y Crick de la estructura del ADN, se pusieron en marcha mecanismos para identificar características en el mismo ADN que pudieran causar las enfermedades neoplásicas. Empezaron a determinarse ciertos genes que estaban implicados en la aparición de múltiples tipos de cáncer, los cuales permitían clasificar en cierta medida los tumores en subgrupos, llamados Biomarcadores<sup>3</sup>. De esta manera, la identificación de receptores hormonales y de crecimiento, permitió el desarrollo de tratamientos más específicos contra los cuerpos tumorales que presentaban cierta expresión de receptores característicos.

Finalmente, pese al gran avance durante todo el siglo XX, todavía quedan muchos retos en los que hay que profundizar e investigar ampliamente durante el presente siglo. Entre estos retos se está investigando la manera de conseguir un diagnóstico precoz, para mejorar el pronóstico, así como unos tratamientos específicos, basados en Biomarcadores propios de cada paciente, que presenten un alto grado de efectividad y especificidad por las células tumorales, intentando conseguir una medicina personalizada.

### **1.2. Cáncer**

El término cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Sin embargo, la célula cancerosa o tumoral pierde la capacidad para morir y se divide de manera casi indefinida. Tal crecimiento y aumento en el número de células llega a formar unas masas, denominadas tumores, que en su expansión pueden invadir y

## 1. Introducción

---

sustituir a los tejidos normales. Por otra parte, algunos cánceres pueden no formar tumores sólidos, como sucede típicamente en los de origen sanguíneo.

Mientras las células normales maduran en tipos celulares muy distintos con funciones específicas, las células cancerosas no lo hacen, por lo que, al contrario de las células normales, las células cancerosas siguen dividiéndose sin detenerse. Estas células pueden tener la capacidad para influir en las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que rodean, lo que se conoce como el microambiente. Al crecer los tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo, por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, produciendo un tumor secundario o lo que también puede denominarse metástasis.

### **1.3. Biología del cáncer de mama**

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica, heterogénea y compleja que varía mucho en base a las características morfológicas, clínicas y moleculares tanto de los pacientes como de los tumores. La heterogeneidad del cáncer de mama puede venir determinada no solo por características como edad de aparición de la enfermedad, tamaño tumoral, invasión de ganglios cercanos, grado histológico y diferentes características clínicas, sino que puede venir también definida por diferencias moleculares, ya sea expresión diferencial de receptores hormonales como Receptor de Estrógenos (RE) o Receptor de Progesterona (RP), como por una diferencia en la expresión del Receptor HER2, y de otros múltiples receptores de membrana, alteraciones tanto a nivel de la estructura genómica, mutaciones específicas de un gen, y propias de cada individuo<sup>4</sup>.

El cáncer de mama empieza cuando las células del tejido mamario crecen de manera descontrolada, debido a que múltiples rutas interconectadas se presentan desreguladas, confiriendo a la célula características especiales,

como la evasión de la muerte celular controlada o apoptosis, activación del ciclo celular de manera continua, y una desregulación de la señalización celular, entre otras muchas características. Dichas rutas diferencialmente desreguladas entre diferentes individuos que padecen la enfermedad confieren un pronóstico, eficacia y sensibilidad de los tratamientos diferente y específico en cada uno de los pacientes.

Estas células, después de múltiples divisiones formarán un cuerpo tumoral que puede ser observado mediante rayos X (llamadas mamografías), o puede apreciarse como un bulto en los senos<sup>5</sup>. La anatomía del seno mamario se muestra en la **Figura 2**.

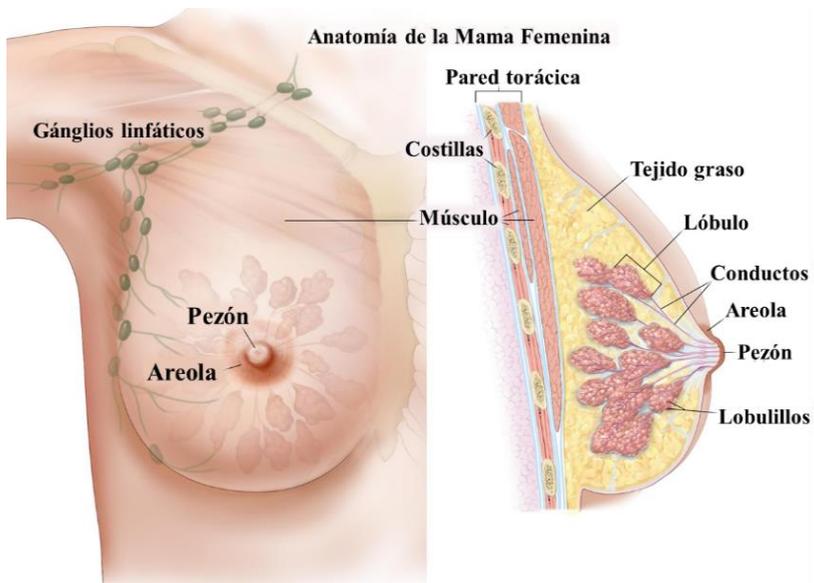


Figura 2. Esquema del seno mamario.

## 1. Introducción

---

La metástasis ocurre cuando células provenientes del tumor primario se expanden a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. Las células pueden entrar en el sistema linfático y quedarse en los ganglios linfáticos, pudiendo crecer, formando tumores en dichos ganglios. Dicha característica se tiene en cuenta en el momento de determinar el estadio tumoral, prediciendo el pronóstico del paciente.

### **1.3.1. Clasificación histológica de los carcinomas mamarios**

Los tumores mamarios pueden ser clasificados en diferentes tipos según el aspecto a nivel histológico, su procedencia celular y la capacidad invasiva que presenten<sup>4,5</sup>.

Carcinoma Ductal. En este tipo de carcinoma el cáncer empieza en los conductos que transportan la leche hasta el pezón. Por una parte, el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es considerado un cáncer de mama no invasivo o preinvasivo. Las células que forman el DCIS pueden considerarse células precancerosas, ya que en algunos casos pueden adoptar capacidades invasivas. Por otro lado, el carcinoma ductal infiltrante o invasivo es el tipo histológico más común dentro del cáncer de mama donde las células se abren paso a través de la pared del conducto, y crecen entre el tejido graso mamario.

Carcinoma Lobular. Este tipo de carcinoma empieza su desarrollo en las glándulas mamarias o lóbulos que generan la leche. Por una parte, el carcinoma lobular *in situ* (LCIS), al igual que el DCIS, es considerado un cáncer de mama no invasivo o preinvasivo. En este caso, en muy raras ocasiones el carcinoma adopta un carácter invasivo. Por otro lado, el carcinoma lobular infiltrante o invasivo empieza en las glándulas productoras de leche, presentando una capacidad invasiva.

- Tipos de cáncer de mama menos comunes

Cáncer de Mama Inflamatorio. La mama afectada adopta la apariencia de piel de naranja, con múltiples hoyos y piel gruesa, debido al bloqueo, por parte de las células cancerosas, de los vasos linfáticos<sup>4,5</sup>.

Enfermedad de Paget del pezón. Muy asociada con el Carcinoma Ductal in situ o con Carcinoma Ductal Infiltrante. Este tipo de cáncer de mama empieza en los conductos y se expande hasta la piel en la región del pezón y por la areola.

Phyllodes tumor. Normalmente considerados benignos, precancerosos o invasivos, dependiendo de las características histológicas como la celularidad estromal, la infiltración tumoral y la actividad mitótica.

Angiosarcoma. Este tipo de cáncer empieza en las células de los vasos sanguíneos o linfáticos. Su aparición está relacionada con una complicación posterior por tratamientos con radiación. Presenta un rápido crecimiento y alta expansión, al estar presentes las células tumorales en los vasos sanguíneos y linfáticos.

- Tipos especiales de carcinomas de mama invasivos

Hay algunos tipos especiales de cáncer de mama poco frecuentes que se consideran subtipos de carcinomas invasivos. Entre ellos destacamos el Carcinoma Cístico Adenoideo, Medular, Mucinoso o Coloidal, Papilar, Tubular, Metaplástico y Micropapilar<sup>4</sup>.

### 1.3.2. Incidencia y mortalidad

A continuación, explicaremos la incidencia del cáncer de mama, así como los factores de riesgo que aumentan dicha incidencia, y la mortalidad.

### **1.3.2.1. Incidencia y factores de riesgo**

El cáncer de mama es, entre las mujeres, el cáncer más común en regiones desarrolladas como Norte América, Europa y la región de Oceanía, correspondiendo con un 23% de todos los tipos de cáncer diagnosticados<sup>6,7</sup>. En España la incidencia aumentó hasta el año 2003, a partir del cual se observa una ligera tendencia a la baja. Aproximadamente, unas 26.000 mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama cada año en España<sup>8</sup>, siendo su diagnóstico más común en pacientes entre 45 y 65 años.

Los factores de riesgo asociados con el cáncer de mama corresponden con estilos de vida de países desarrollados, relacionados con la dieta, exceso de masa corporal en edades postmenopáusicas, uso de terapia hormonal durante la menopausia, sedentarismo, consumo de drogas y alcohol, y cambios en los hábitos reproductores y factores hormonales, como un largo historial menstrual, anticonceptivos orales o el embarazo en edades tardías<sup>9,10</sup>. La mayoría de factores descritos tienen cierta influencia en el envejecimiento celular, mutaciones y cambios a nivel del genoma. Por otro lado, entre un 5-10% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama presentan un factor hereditario, presentando mutaciones en genes de alta penetrancia, como los encargados de la reparación del daño al ADN, BRCA1 y BRCA2. Otros factores clínicos como senos de tejido denso, presentar una menstruación antes de los 12 años o empezar la menopausia después de los 55 años<sup>4</sup>, también pueden ser factores de riesgo relevantes.

### **1.3.2.2. Mortalidad**

El cáncer de mama es el cáncer con la tasa de mortalidad más alta entre las mujeres de todo el mundo. En un estudio realizado en 2012 por la Organización Mundial de la Salud se observó que la tasa era de 521.900 muertes al año aproximadamente<sup>11</sup>, correspondiendo con 130.000 muertes en Europa<sup>12</sup>, siendo más común en aquellos países más desarrollados, ya que

prevalecen los factores de riesgo asociados con cáncer de mama anteriormente descritos<sup>13</sup>. En España el cáncer de mama es la segunda causa de muerte más común entre las mujeres después de las enfermedades cardiovasculares, produciéndose aproximadamente 6.200 muertes en 2012<sup>14</sup>. A pesar de todo ello, la mortalidad por este tipo de cáncer ha disminuido desde inicios de la década de los 90, debido a una detección más temprana de la enfermedad, y de una mayor efectividad de los tratamientos<sup>15,16</sup>.

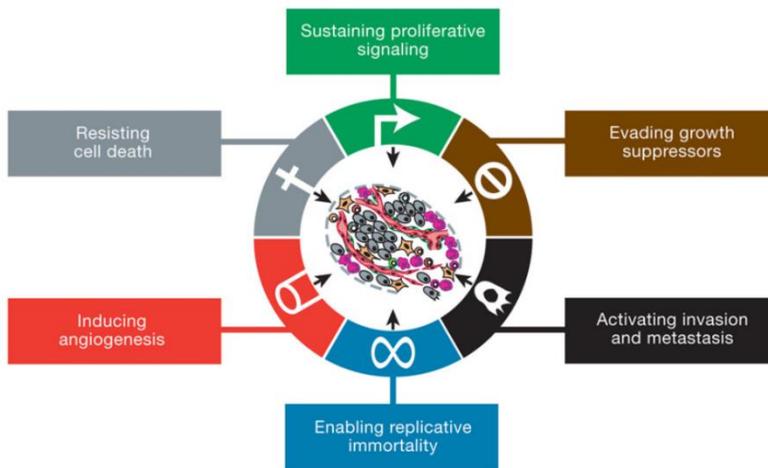
### 1.3.3. ¿Qué causa su aparición?

Se han descrito diferentes mecanismos que causan la aparición del cáncer, y de manera más específica del cáncer de mama. Estos mecanismos permiten a la célula crecer, proliferar, invadir, adaptarse y resistir frente a fármacos. Los mecanismos se basan en alteraciones a nivel genómico, en mutaciones en ciertos genes importantes, o al cambio del patrón de expresión de una serie de proteínas. Las alteraciones y mutaciones pueden suponer una activación o inactivación de ciertos genes implicados en apoptosis, o muerte celular programada, llamados genes supresores de tumores (Oncoprotectores), o en genes implicados en la proliferación y supervivencia (Oncogenes)<sup>14</sup>.

En un estudio realizado por Weinberg y Hanahan<sup>17,18</sup> (**Figura 3**) se afirmaba que los tumores surgían debido a la adquisición de ciertas alteraciones fenotípicas de la fisiología celular que desencadenaban la transformación y el crecimiento con carácter carcinogénico de las células. Estas alteraciones descritas eran las siguientes:

1. Proliferación celular autónoma.
2. Insensibilidad a señales antiproliferativas.
3. Evasión de apoptosis (muerte celular programada).
4. Inducción de angiogénesis.
5. Capacidad de división indefinida (inmortalidad replicativa).
6. Capacidad de invasión y metástasis.

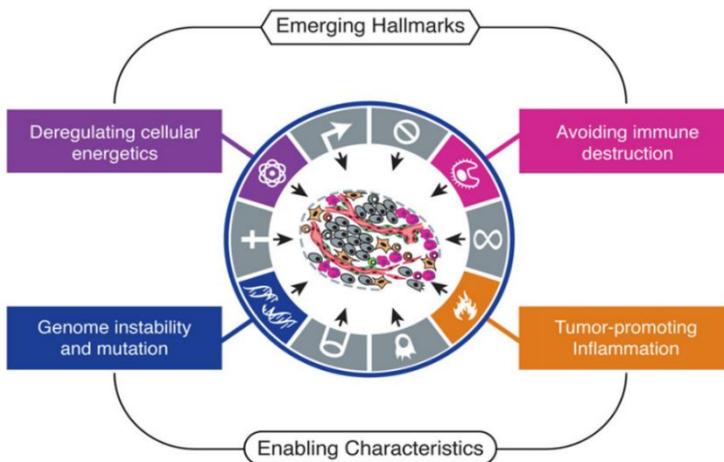
## 1. Introducción



**Figura 3. Hallmarks of Cancer postulados por Weinberg y Hanahan.**

En un estudio posterior, Weinberg y Hanahan incluyeron dos nuevas alteraciones al listado previo, y añadieron dos nuevas características habilidades debido a las diferentes alteraciones ya descritas<sup>18</sup> (**Figura 4**).

7. Evasión de los mecanismos inmunes.
8. Desregulación del metabolismo celular.
9. Inestabilidad genómica.
10. Inflamación promovida por tumores.



**Figura 4. Hallmarks of Cancer posteriormente postulados por Weinberg y Hanahan.**

### 1.3.4. Clasificación

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea. Por ello, se dice que el cáncer no es una única enfermedad, sino el cúmulo de muchas enfermedades. Durante los últimos años se ha demostrado que dicha enfermedad no está causada únicamente por mutaciones o alteraciones en un gen o en una única región genómica, sino que diferentes alteraciones moleculares, como mutaciones génicas, deleciones, amplificaciones, o diferentes patrones epigenéticos<sup>19-24</sup>, conforman la enfermedad. Estas múltiples alteraciones dan como resultado la desregulación, no solo de una ruta, sino de muchas rutas interconectadas entre sí, alterando múltiples factores. Además, se ha demostrado que el microambiente celular y las características propias de cada uno de los pacientes también influyen en la enfermedad<sup>25</sup>. Por ello, el mismo tipo de cáncer puede no comportarse exactamente igual en dos pacientes diferentes, ni responder a los fármacos con la misma efectividad.

Durante los últimos años se ha intentado clasificar el cáncer de mama según su pronóstico tumoral, dependiendo de su fenotipo molecular, expresión de receptores hormonales y según la expresión de genes intrínsecos. El objetivo de esta serie de clasificaciones está basado, por lo tanto, en intentar agrupar los diferentes tipos de cáncer de mama en subtipos suficientemente diferentes unos de otros, los cuales puedan predecir el pronóstico tumoral, así como la efectividad frente a los diferentes fármacos.

#### 1.3.4.1. Pronóstico tumoral

La alta heterogeneidad que presenta el cáncer de mama provoca que los pacientes tengan diferentes pronósticos y respuesta frente al tratamiento elegido. Diferentes *microarrays* genéticos de expresión fueron utilizados para observar el pronóstico de los pacientes. La finalidad de los mismos era identificar o bien pacientes con un buen pronóstico, permitiendo así el uso de

## 1. Introducción

---

un tratamiento menos agresivo, o pacientes que presentaban un mal pronóstico, indicando la necesidad de administración de fármacos más agresivos frente al tumor<sup>26-34</sup>.

A pesar de que los diferentes estudios presenten diferencias entre los genes elegidos para realizar la clasificación según el pronóstico tumoral, todos ellos identifican el mismo grupo de pacientes con mal pronóstico<sup>35,36</sup>. Después de múltiples estudios se llegó a la conclusión que mediante el análisis de genes relacionados con la proliferación celular se puede predecir el pronóstico del paciente con cáncer de mama<sup>35</sup>, siendo uno de los factores pronóstico más relevantes en tumores con Receptores de Estrógeno positivo (RE+) <sup>35,37-40</sup>. Se sabe que los niveles de expresión de genes relacionados con la proliferación son altos en tumores con Receptores de Estrógeno negativo (RE-), agrupando estos tumores en el apartado de un mal pronóstico <sup>35,37-40</sup>. Debido a que estos test están compuestos básicamente de genes relacionados con la proliferación, la mayoría de los resultados obtenidos de pronóstico correlacionarán con la respuesta frente a agentes quimioterapéuticos convencionales basados en fármacos que actúan sobre células con un alto índice proliferativo<sup>37,40,41</sup>. Entre los test de primera generación explicados anteriormente se encuentran MammaPrint<sup>29</sup>, Veridex 76 gene, MapQuant Dx<sup>42</sup> y MapQuant Dx<sup>42</sup>/Simplified<sup>43</sup>, Oncotype<sup>44,45</sup> y Theros<sup>31,34,46</sup>.

Durante los últimos años se han desarrollado *arrays* de segunda generación de pronóstico tumoral basados, no solo en genes relacionados con la proliferación, sino también en la respuesta inmune tumoral <sup>38,39,41,47</sup>.

### **1.3.4.2. Fenotipo molecular**

Una de las primeras clasificaciones del cáncer de mama está basada únicamente en la expresión de receptores de membrana y receptores hormonales. Estos subtipos son subclasificados según el estado del Receptor de Estrógenos (RE), Receptor de Progesterona (RP), el receptor de factores de

crecimiento epidérmico ERBB2 (HER2), ciertas citoqueratinas como CK 5/6 y por EGFR<sup>48-52</sup>. Mediante este mecanismo se obtiene una forma rápida y sencilla de clasificación tumoral en diferentes subtipos con pocos recursos y marcadores. Según la combinación de la expresión de los anteriores marcadores, estudiados mediante inmunohistoquímica, se separan cuatro subtipos básicos:

- Luminal A. Se agrupan en este subgrupo aquellos tumores que presentan el RE-positivo y/o RP-positivo y HER2-negativo.
- Luminal B. Se agrupan en este subgrupo aquellos tumores que presentan el RE-positivo y/o RP-positivo y HER2-positivo.
- Subtipo HER2. Se agrupan en este subgrupo aquellos tumores que presentan el RE-negativo y RP-negativo y HER2-positivo.
- Triple Negativo. Se agrupan en este subgrupo aquellos tumores que presentan el RE-negativo y RP-negativo y HER2-negativo. Además, presentan positividad para CK 5/6 y/o para EGFR.

En aquellos casos en los que se obtienen los 5 marcadores negativos, los tumores no pueden ser clasificados, siendo imposible establecer estos tumores en ninguno de los subtipos anteriormente mencionados.

### 1.3.4.3. Genes intrínsecos

Para realizar una mejor clasificación de los tumores, se propuso la adición de nuevos marcadores que, junto con los avances en el análisis genético mediante *arrays* de expresión, permiten clasificar de manera más precisa y exacta los tumores en su subtipo correspondiente. Mediante esta clasificación intrínseca se propuso el listado de subtipos, que sirvió de punto de inicio para la clasificación más precisa y exacta de los últimos años.

En el año 2000 el grupo de Sorlie y Perou intentó clasificar los tumores sin tener datos clínicos previos<sup>53</sup>. Identificaron un conjunto de 496

## 1. Introducción

---

genes diferencialmente expresados en los tumores de diferentes pacientes, pero mínimamente variables entre las muestras del mismo tumor (genes “intrínsecos”). Mediante estos genes fue posible la clasificación inicial en cuatro subtipos: Luminal/ER+, ERBB2+, Basal-like y Normal-like. En un estudio posterior de Sorlie<sup>54</sup>, varios años después, se añadieron mayor cantidad de muestras. Mediante una firma de 534 genes se consiguió repetir la clasificación anteriormente descrita por Perou, con la única diferencia de que en este caso el subtipo Luminal se dividía en dos subtipos diferentes: Luminal A y Luminal B, con características y pronóstico tumoral<sup>55,56</sup> diferente entre ellos<sup>54</sup>.

Con el objetivo de simplificar la firma genética, Parker<sup>57</sup> desarrolló una firma de 50 genes que reproducía esta clasificación a la que denominó PAM50. Esta firma constaba de 50 genes relacionados con diferentes aspectos tumorales, como la adhesión, la muerte celular, la proliferación, migración, y que daban un valor predictivo del pronóstico del paciente.

Durante los últimos años se han realizado diferentes estudios que han validado los experimentos de clasificación de Perou y de Sorlie<sup>49,57-59</sup>, y la profundización en la clasificación de los diferentes subtipos no ha dejado de crecer<sup>60</sup>. Fruto de ello, en un estudio de 2007 un nuevo subtipo fue identificado, llamado Claudin-low<sup>61</sup>. Este subtipo no presentaba expresión de ER, PR y HER2, al igual que el subtipo Basal-like. Presentaba una baja expresión de genes implicados en uniones célula-célula, como claudinas y E-Cadherina, y una alta expresión de marcadores linfocitarios y de células endoteliales, mostrando incluso propiedades biológicas similares a las de las células madre tumorales.

La clasificación que más información aporta en cuanto a la biología molecular del cáncer de mama es la clasificación por subtipos intrínsecos. A continuación detallamos las características de los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama identificados en los últimos años<sup>62</sup>.

#### 1.3.4.3.1. Luminal A

El subtipo Luminal A es el subtipo de cáncer de mama más común, representando entre un 50-60% del total. Este subtipo está caracterizado por la expresión de genes resultantes de la activación del receptor de estrógenos, típicamente expresado en el epitelio luminal de los ductos mamarios. Además, este subtipo presenta una baja expresión de genes relacionados con la proliferación<sup>53,55</sup>, es decir, el subtipo Luminal A se caracteriza por la expresión de RE, RP, Bcl-2 y citoqueratinas CK8/18, así como la falta de expresión del receptor HER2, un ratio bajo de proliferación según los estudios analizando Ki67<sup>63</sup> y un bajo grado histológico.

El pronóstico de los pacientes de cáncer de mama que presentan este subtipo es favorable, presentando una tasa de recaída mucho más baja que el resto de subtipos, siendo del 28%. Los pacientes que padecen este tipo tumoral, no solo tienen una tasa de recaída más baja, sino que en el momento de la recaída, el tiempo de supervivencia es mayor que el resto de subtipos, siendo de 2,2 años<sup>64</sup>. Las principales regiones del organismo donde se produce la recaída son con un 18,7% el hueso y un 10% el sistema nervioso central, siendo más baja en hígado y pulmones.

#### 1.3.4.3.2. Luminal B

El subtipo de cáncer de mama Luminal B engloba entre un 10-20% del total. Tiene un fenotipo agresivo, con un alto grado histológico, un alto índice proliferativo y un mal pronóstico<sup>53,55</sup>. Tanto el subtipo Luminal A, como el Luminal B pueden presentar expresión del receptor de estrógenos, pero presentan un pronóstico diferente.

El subtipo Luminal B se caracteriza por presentar una mayor cantidad de genes de proliferación sobreexpresados, como pueden ser *MKI67*, *CCNB1*, *EGFR* y en ocasiones también *HER2*<sup>62</sup>. Mediante inmunohistoquímica se ha

## 1. Introducción

---

conseguido diferenciar entre Luminal A y Luminal B mediante la proteína Ki67, como un posible biomarcador diferencial<sup>51,63,65</sup>. Por lo tanto, el subtipo Luminal A puede definirse como RE+/HER2- y bajo Ki67, mientras que el Luminal B se define como RE+/HER2+. Hay que destacar que un cierto número de tumores dentro del subtipo Luminal B, pueden ser erróneamente clasificados como RE-/HER2-.

Aunque los tumores del subtipo Luminal B tiene un peor pronóstico que los del Luminal A, presentan una mejor respuesta a los tratamientos neoadyuvantes consiguiendo una respuesta patológica completa (pCR) en un 17% de los tumores Luminal B frente al 7% en los Luminal A. Sin embargo, estas pCR son muy bajas si las comparamos con los subtipos HER2 y Basal-like, con un 36% y 43%, respectivamente<sup>66</sup>. Aunque el hígado es la región donde predomina la recaída (30%), este subtipo tiene una recaída más elevada que el Luminal A en hígado (14%). La supervivencia desde el tiempo de recaída es más baja si lo comparamos con el subtipo Luminal A, con una media de 1,6 años<sup>64</sup>.

### **1.3.4.3.3. ERBB2+ (HER2+)**

El subtipo de cáncer de mama HER2+ engloba entre un 15-20% del total. Está caracterizado por presentar una sobreexpresión del gen HER2 y otros genes asociados a la ruta de HER2, y del amplicón localizado en la región cromosómica 17q12. Los tumores pertenecientes a dicho subtipo muestran una sobreexpresión de genes relacionados con proliferación celular, además de una baja expresión de genes con características luminales<sup>14,62</sup>. Un 75% de los tumores englobados dentro de este subtipo presentan un alto grado histológico, con un 40% de mutaciones en el gen TP53, y caracterizados por presentar una alta proliferación. Todo esto hace que este subtipo presente un mal pronóstico.

La clasificación molecular de este subtipo no corresponde perfectamente con la clasificación intrínseca, ya que solo el 70% de los tumores que presentan

HER2+ amplificado mediante un *array* de expresión, realmente lo muestran sobreexpresado por inmunohistoquímica. Por ello, es habitual que un número significativo de tumores RE+/HER2+ sean erróneamente clasificados dentro del subtipo Luminal B <sup>24,57</sup>.

Algunos estudios han separado el subtipo HER2 en diferentes subgrupos con diferente pronóstico. Por una parte, uno de estos grupos presenta un 12% de supervivencia a los 10 años, mientras que, por otro lado, tumores pertenecientes a los otros subgrupos presentan un 50% de supervivencia<sup>67</sup>.

Aunque el subtipo HER2 presente un mal pronóstico, tratamientos como el Trastuzumab, obtenidos durante la pasada década, han mejorado sustancialmente la supervivencia tanto en estadios iniciales de estos tumores, como en enfermedades metastásicas<sup>68-70</sup>. Este subtipo tiene una alta respuesta frente a tratamientos neoadyuvantes, consiguiendo un mayor porcentaje de respuesta que ambos subtipos luminales juntos<sup>62</sup>.

### 1.3.4.3.4. Basal-like

El subtipo de cáncer de mama Basal-like engloba entre un 10-20% del total. Este subtipo está caracterizado por presentar la expresión de genes como CK5, CK17, P-cadherina, Caveolina 1 y 2, Nestina, CD44 y EGFR. Además también expresa algunos genes característicos del epitelio mesenquimal como CK8/18 y Kit, pero a unos niveles mucho más bajos que los carcinomas de subtipo luminal<sup>62</sup>. Están caracterizados por su aparición en edades tempranas, predominantemente en mujeres de origen africano. Este subtipo presenta un gran tamaño tumoral en el momento del diagnóstico, un alto grado histológico y una alta frecuencia de expansión a nodos linfáticos<sup>71</sup>.

Los tumores del subtipo Basal-like suelen ser de tipo carcinoma ductal infiltrante con un alto grado mitótico, necrosis tumoral, con bordes expansivos y una clara respuesta linfocítica estromal<sup>72</sup>. El patrón metastático es altamente

## 1. Introducción

---

agresivo con predominancia sobre órganos viscerales, principalmente pulmón, sistema nervioso central y nodos linfáticos<sup>64,73</sup>. Lo que caracteriza a este subtipo es la falta de expresión de los tres receptores clave en cáncer de mama como el RE, RP y HER2. Esto significa que los tumores que no expresan ninguno de estos tres receptores son llamados Triple Negativo (TN). Esto no quiere decir que todos los tumores Basal-like sean TN, ya que un 30% no lo son<sup>74</sup>.

Los tumores Basal-like presentan un alto ratio de mutaciones en genes como TP53, lo que puede explicar su alta agresividad y su mal pronóstico<sup>55</sup>. En este subtipo se agrupan aquellos tumores que presentan alteraciones sobre el gen *BRCA1*<sup>54</sup> basadas en cambios carácter epigenético o mutaciones del mismo gen, predisponiendo al desarrollo de tumores Basal-like con pérdida de expresión de RE y a un mal pronóstico. Debido a la mutación en el gen *BRCA1*, se acumulan errores y mutaciones en el genoma, favoreciendo la inestabilidad y el crecimiento de tumores.

Este subtipo presenta un peor pronóstico si lo comparamos con los subtipos luminales<sup>54,55</sup>, con un alto porcentaje de recaída dentro de los 3 primeros años<sup>75</sup>, a pesar de presentar una alta respuesta a la quimioterapia<sup>76</sup>.

Para tratar estos tumores se han desarrollado estrategias durante los últimos años, basadas en inhibidores del enzima poli-ADP ribosa-polimerasa 1 (*PARP-1*), encargada de reparación del ADN. La inhibición de esta enzima tiene la finalidad de evitar que la célula repare los fallos en el genoma, acumulándose tal cantidad de errores que lleven la célula a la muerte. Diferentes estudios en fase I están evaluando el Olaparib como terapia en tumores de cáncer de mama con mutaciones en *BCRA1* y *BCRA2*, observándose un grado de respuesta del 47% y un beneficio clínico del 63%<sup>77</sup>.

#### 1.3.4.3.5. Claudin-low

El subtipo de cáncer de mama Claudin-low engloba entre un 10-15% del total. Este tipo de tumores corresponden con el tipo de carcinoma ductal infiltrante con un alto grado tumoral, que puede presentar diferenciación metaplásica o medular<sup>20,78</sup>. Su característica más notable, la cual le da nombre, es la baja expresión de genes implicados en la adhesión celular, como Claudina-3, Claudina-4, Claudina-7, Ocludina y E-cadherina. Este subtipo es semejante al subtipo Basal-like, ya que ambos tipos comparten algunas características en cuanto a la expresión de genes como la baja expresión de HER2 y genes luminales. A pesar de estas semejanzas, tiene grandes diferencias, ya que sobreexpresa un conjunto de 40 genes implicados en la respuesta inmune, indicando una alta infiltración tumoral de células inmunitarias<sup>20,57</sup>.

Los tumores Claudin-low presentan un mal pronóstico, ya que, aunque presentan una baja expresión de genes implicados en la proliferación celular, presentan la sobreexpresión de genes implicados en la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesenquimal. Todas estas características se asocian con la adquisición de un fenotipo de células madres cancerígenas (del inglés *cancer stem cells*, CSC). Clasificando estos tumores mediante inmunohistoquímica normalmente son TN, pero al igual que en el subtipo basal-like, donde no todos los tumores son TN, podemos decir que no todos los tumores Claudin-low son TN, ya que alrededor de un 20% son positivos para receptores hormonales<sup>24</sup>. Estos tumores muestran mal pronóstico<sup>20</sup> y una baja respuesta a quimioterapia neoadyuvante con unos valores intermedios entre tumores luminales y basales<sup>24</sup>.

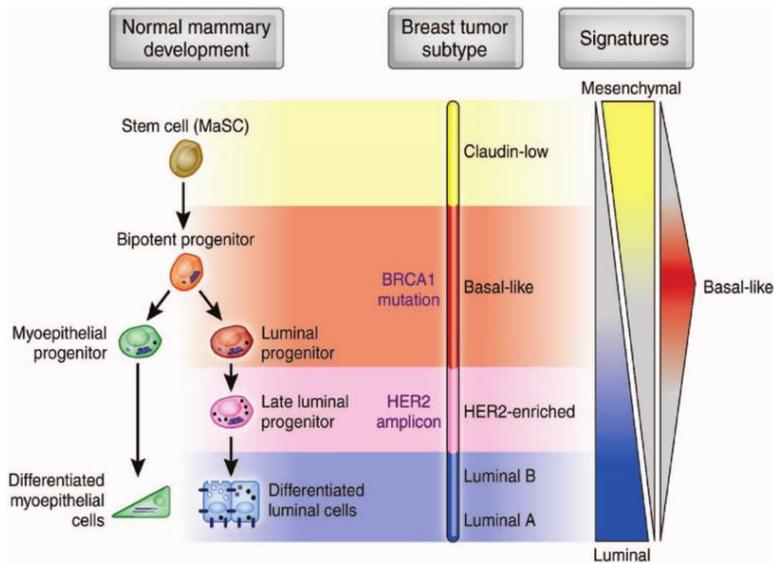
#### 1.3.4.3.6. Normal-like

El subtipo de cáncer de mama Normal-like engloba entre un 5-10% del total. Estos tumores están poco caracterizados y han sido agrupados dentro

## 1. Introducción

de la clasificación intrínseca como fibroadenomas y muestras mamarias normales<sup>53</sup>. El pronóstico de estos tumores es intermedio entre luminales y Basal-like, mientras que la respuesta completa a quimioterapia neoadyuvante es negativa. Al igual que los tumores TN, estos tumores no expresan RE, RP ni HER2, pero no pueden ser clasificados dentro de los tumores Basal-like ya que no expresan CK5 ni EGFR. La significatividad clínica de estos tumores todavía no ha podido llegar a ser entendida, debido a que es poco frecuente y es difícil realizar estudios con pocas muestras. Además, existen diversos estudios que dudan de su existencia real, explicando que la presencia de este subtipo puede deberse a un artefacto por contaminación con tejido normal en los *arrays*<sup>79</sup>.

Las características más básicas de los diferentes subtipos relacionados con el grado de diferenciación celular y características básicas de cada subtipo, se resumen en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Esquema del nivel de diferenciación y clasificación de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.

### 1.3.4.4. Subclasificación del cáncer de mama Triple Negativo

Durante los últimos años se han identificado diferentes subtipos de cáncer de mama Triple Negativo<sup>74,80-82</sup>. Estos estudios han demostrado que los tumores TN son altamente heterogéneos a nivel transcripcional, siendo esta heterogeneidad molecular de los tumores TN uno de los mayores retos en el momento de mejorar la supervivencia de los pacientes y de desarrollar terapias dirigidas para pacientes. Hoy en día se está estudiando la mejor manera de subclasificar estos tumores, antes de encontrar dianas terapéuticas. Desde que Perou publicó su estudio categorizando los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama mediante perfiles de expresión génica, ésta metodología ha servido para intentar identificar y clasificar dianas terapéuticas relevantes<sup>83</sup>. Diferentes estudios han postulado múltiples clasificaciones, siendo la clasificación de Lehman la más aceptada.

#### 1.3.4.4.1. Lehman

En un estudio del año 2007<sup>74</sup> ya se desvelaba una posible clasificación de tumores TN. En este estudio se dijo que estos tumores son sinónimos de tumores Basal-like, aunque se distinguieron 5 grupos diferentes mediante análisis bioinformáticos.

En 2011, investigadores de la Universidad de Vanderbilt clasificaron el cáncer de mama TN en diferentes subtipos<sup>80</sup>. Mediante el análisis de expresión génica de 587 tumores TN, observaron que existían 6 subtipos diferentes que tenían unas características biológicas únicas y con diferentes respuestas al tratamiento. Estos 6 subtipos consistían en:

- Subtipo Basal-like 1 (BL1). Caracterizado por presentar un aumento de la actividad de los componentes y rutas relacionadas con el ciclo celular y división celular, además de poseer unos niveles elevados de genes relacionados

## 1. Introducción

---

con la respuesta al daño al ADN como *ATR* y *BRCA1*, así como mutaciones en este último gen.

-Subtipo Basal-like 2 (BL2). Caracterizado por presentar una alta actividad en las rutas de factores de crecimiento (como *EGF*, *NGF*, *MET*, *IGF1R* y *Wnt/β-CATENIN*), de glicólisis y gluconeogénesis. Algunos marcadores demuestran el origen basal/mioepitelial de este subgrupo.

-Subtipos Mesenquimales (Mesenquimal (M) y Mesenquimal Stem-like (MSC)). Por una parte, el subtipo Mesenquimal está relacionado con componentes y rutas implicados en la movilidad celular, interacción con receptores de la matriz extracelular (ECM), y rutas de diferenciación (como la ruta Wnt, ruta ALK, y la ruta de señalización TGF-β). Por otra parte, el subtipo Mesenquimal Stem-like comparte características biológicas con el subtipo Mesenquimal, incluyendo motilidad celular, diferenciación celular y rutas de crecimiento. Sin embargo, algunos genes representan de manera única a este subtipo, como son genes relacionados con factores y rutas de crecimiento, que incluyen, el metabolismo del inositol fosfato, *EGFR*, *PDGR*, señalización del calcio, receptor de proteínas G, y la señalización de componentes como ERK1/2, así como transportadores ABC y señalización de adipocitoquinas.

-Subtipo Inmunomodulador (IM). Presenta funciones biológicas relacionadas con células y procesos inmunes. Estos procesos incluyen señalización celular inmunitaria (como la ruta TH1/TH2, la ruta celular NK, receptores celulares de células B, rutas DC, y señalización de receptores de células T), señalización de citoquinas (rutas de citoquinas, rutas de la IL-2 y la IL-7), presentación y procesamiento de antígenos, y la señalización a través del *core* de la ruta de señalización de señales inmunes. Las características de este subtipo son propias de las células tumorales, y no son el resultado de una infiltración como resultado de una respuesta inmune.

-Subtipo Receptor de Andrógenos Luminal (LAR). Este subtipo está relacionado con rutas reguladoras hormonales, incluyendo la síntesis de

esteroides, metabolismo de porfirinas y metabolismo de estrógenos y andrógenos. Los niveles de expresión del receptor de Andrógenos están muy elevados, con una media de 9 veces más expresados que el resto de subtipos. Estos tumores también expresan numerosos elementos diana *downstream* del receptor de andrógenos y coactivadores.

### 1.3.5. Tratamientos

En el momento de la detección del cáncer de mama se plantean diversas maneras mediante las que tratar a las pacientes diagnosticadas, dependiendo de subtipo y del estadio tumoral.

#### 1.3.5.1. Quimioterapia convencional

La mayoría de las mujeres con cáncer de mama reciben quimioterapia, un tratamiento sistémico que llega a todas las partes del cuerpo, no solo al pecho, y en el que suelen observarse gran cantidad de efectos secundarios.

La quimioterapia es un tratamiento basado en fármacos que afectan, normalmente, a las células tumorales, aunque no únicamente y de manera inespecífica. Estos fármacos pueden ser administrados previamente a una cirugía (quimioterapia neoadyuvante), o posteriormente a una cirugía (quimioterapia adyuvante).

Los fármacos más comúnmente utilizados afectan la integridad del ADN, receptores de membrana, rutas de señalización y respuesta inmune. La pérdida de pCR está asociado con un alto riesgo de recaída y muerte de los pacientes<sup>84</sup>, así como resistencia a la quimioterapia<sup>85,86</sup>.

En la mayoría de los casos la quimioterapia es más efectiva si se realiza una combinación mediante diversos fármacos. La mayoría de fármacos utilizados para quimioterapia neoadyuvante incluyen antraciclinas, como Doxorubicina

## 1. Introducción

---

y Epirrubicina; taxanos, como Paclitaxel y Docetaxel; 5-fluorouracil (5-FU); Citofosfamida y Carboplatino.

Algunos de los fármacos más comúnmente utilizados se describen a continuación:

### Estabilizadores de microtúbulos

Los estabilizadores de microtúbulos (como los taxanos) son un grupo de potentes polimerizadores de tubulinas. Muchos estudios han demostrado que los taxanos (Paclitaxel, Docetaxel, Cabazitaxel) son más efectivos para tumores del subtipo TN que para aquellos con recetores positivos<sup>87,88</sup>.

En pacientes metastáticos del subtipo TN, con resistencia frente a taxanos o antraciclinas, se utiliza una combinación de Ixabepilona<sup>89,90</sup> y Capacitabina, mejorando la supervivencia libre de progresión (PFS), si se compara con Capacitabina únicamente (4.1 vs 2.1 meses)<sup>91</sup>. Esta combinación puede ser utilizada en pacientes que no toleran combinaciones de cisplatino o cuando las funciones renales están comprometidas<sup>92</sup>.

### Antraciclinas

Las antraciclinas (Doxorubicina y Epirrubicina) son unos de los fármacos más efectivos en el cáncer de mama, los cuales han mostrado una alta efectividad sobre tumores TN debido a su alta sensibilidad<sup>91,93</sup>. Aunque el beneficio de las antraciclinas sobre tumores TN ha permanecido en cierta controversia durante los últimos años<sup>92,94</sup>, en ciertos estudios se ha demostrado que un tratamiento con antraciclinas, junto con una combinación con taxanos, presenta un claro beneficio frente a tumores de mama TN con nodos positivos<sup>95</sup>. Durante los últimos años se han realizado ensayos y estudios, intentando encontrar sensibilidades y resistencias de los pacientes frente a estos fármacos, y se ha observado que, por ejemplo, alteraciones en la Topoisomerasa IIa es una de las causas más comunes que provoca la resistencia a antraciclinas<sup>86,96</sup>.

### Agentes basados en el platino

El platino actúa en la célula generando enlaces cruzados intracatenarios e intercatenarios entre la doble cadena de ADN, impidiendo la formación de la horquilla de replicación, produciendo la rotura de la doble cadena y problemas en la replicación. Debido a mutaciones en los genes de reparación *BRCA*, los fármacos basados en el platino son más efectivos y producen una muerte celular más elevada<sup>97</sup>. Estos fármacos están implementados, por lo tanto, en aquellos pacientes que presentan los genes *BRCA* mutados, como segunda línea de tratamiento posterior a falta de pCR de tratamiento con quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos<sup>98</sup>. Diversos estudios demostraron que el incremento de la pCR causada por Carboplatino fue mayor en pacientes sin mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*<sup>99</sup> y en pacientes con unos altos niveles de infiltración por linfocitos<sup>100,101</sup>.

### **1.3.5.2. Terapias dirigidas y resistencias al tratamiento en tumores Triple Negativo**

Los investigadores han desarrollado nuevos tipos de terapias más específicas durante los últimos años, a medida que se han ido profundizando los estudios de las causas y cambios que producen un aumento del crecimiento de las células tumorales. Estas terapias dirigidas están diseñadas para bloquear el crecimiento y la expansión de las células tumorales. A diferencia de la quimioterapia convencional, donde se atacan todas aquellas células del organismo que presentan un crecimiento rápido, estos fármacos son específicos únicamente de células tumorales. Las terapias dirigidas pueden ser efectivas, incluso cuando se ha obtenido resistencia a la quimioterapia, además de ayudar conjuntamente con otros tipos de tratamiento<sup>4</sup>.

En la actualidad, el único tratamiento específico aprobado por la *Food & Drugs Administration* (FDA) para el subtipo de tumores TN es la quimioterapia basada en taxanos y antraciclinas<sup>102</sup>, por lo que es necesario un

## 1. Introducción

---

mayor conocimiento de marcadores de respuesta a tratamiento. Entre 41 marcadores de subclasificación de pronóstico tumoral, el receptor tiroideo beta<sup>103</sup> puede prever la respuesta en pacientes con tumores del subtipo TN<sup>104</sup>. Además, no solo es necesario la búsqueda de marcadores de respuesta, sino que es también necesaria la búsqueda de biomarcadores sobre los que poder dirigir tratamientos específicos.

Aunque se ha observado que el cáncer de mama TN inicialmente responde a una combinación de antraciclinas y taxanos, sigue siendo un reto el hecho de que el tratamiento no funcione con la misma efectividad en todos los pacientes y el alto riesgo de recaída de la enfermedad<sup>105</sup>.

Debido a la necesidad de predecir la respuesta de un tratamiento y el pronóstico de los pacientes, durante la última década se ha profundizado en la búsqueda de biomarcadores en la célula tumoral, que difieren de las células normales. Nos puedan ayudar a predecir el pronóstico, la eficiencia del tratamiento y la selección de los pacientes sobre los que le pueda ser más efectivo un tratamiento u otro<sup>106</sup>.

Algunos de los biomarcadores estudiados en la actualidad, con el propósito de determinar una terapia dirigida efectiva, son las proteínas de la familia BRCA. En los tumores TN existe una alta tasa mutación en la familia de estas proteínas, implicadas en la reparación del ADN, creando en alguna de los grupos de tumores TN una firma denominada “BRCAness”. En estos tumores, se ha estudiado el efecto de la adición de ciertos inhibidores de PARP, una proteína implicada en la reparación de ADN, como el Olaparib<sup>104</sup>, Veliparib o Nariparib<sup>107</sup>. La inhibición de PARP potencia los mecanismos de destrucción tumoral por daño al ADN como la radiación ionizante, componentes de metilación del ADN, inhibidores de la topoisomerasa y sales de platino<sup>97</sup>. Diferentes estudios clínicos siguen en desarrollo<sup>77,108,109</sup> con diversos efectos observados.

Durante los últimos años se han estudiado diversos mecanismos de tratamiento menos conocidos, dirigidos frente a los tumores TN que están actualmente en estudio y desarrollo dentro de diversos ensayos clínicos. Debido a que los tumores TN presentan unas características diferentes en cuanto a la infiltración por linfocitos<sup>110</sup> y un alto poder de generar neoantígenos<sup>111,112</sup>, se ha decidido estudiar mecanismos mediante los que tratar los tumores según activaciones o inhibiciones de moléculas reguladoras o implicadas del sistema inmune<sup>101</sup>. Por una parte se ha observado una sinergia entre la quimioterapia convencional y la inmunoterapia<sup>113</sup>, donde se han obtenido resultados prometedores. Esto implica un nuevo campo de estudio en el que probar diferentes fármacos anti PD-L1 (Atezolizumab) y PD1 (Pembrolizumab)<sup>114</sup>, junto con una combinación de inhibidores de diferentes puntos de control del sistema inmune<sup>115</sup> y con otros agentes como inhibidores de receptores tirosina quinasa, inhibidores de MEK, inhibidores de PI3K, agentes antiangiogénicos o moléculas coestimuladoras<sup>101</sup>.

Las rutas de desarrollo y resistencia tumoral son los puntos donde encontrar elementos importantes sobre los que puedan actuar ciertos fármacos. Estos fármacos serán tratamientos dirigidos, que estarán diseñados para el bloqueo específico de la proliferación de las células tumorales, al interferir con moléculas determinadas que son relevantes en el cáncer y que, a pesar de poder estar presentes en los tejidos normales, a menudo están mutadas o sobreexpresadas en los tumores.

El subtipo de cáncer de mama TN suele presentar resistencia a tratamientos con quimioterapia debido a la adquisición de mecanismos de resistencia que dan como resultado la evasión de la apoptosis y el mantenimiento de la división celular<sup>116</sup>. Esta adquisición de mecanismos de resistencia puede deberse a alteraciones por mutaciones o alteraciones de elementos reguladores de rutas clave en apoptosis o proliferación<sup>117</sup>. Esto provoca que diversas interacciones entre proteínas, o entre proteínas y genes, no puedan ser llevadas a cabo, alterando finalmente toda una serie de rutas que

## 1. Introducción

---

no pueden ser representadas por un único biomarcador, y que en diversas ocasiones tienen que ser estudiadas como un total<sup>118</sup>.

En los tumores TN, la resistencia a la quimioterapia (taxanos y antraciclinas) está basada principalmente en el transporte de los fármacos al espacio extracelular, mediante una serie de transportadores, utilizando energía en forma de ATP<sup>119</sup>. La sobreexpresión de los transportadores puede ocurrir en cualquier subtipo y está correlacionado con un mal pronóstico<sup>120</sup>. Además, se han observado ciertas resistencias a las terapias dirigidas que están en desarrollo, como los inhibidores de PARP. Estas resistencias están basadas en la recuperación de la funcionalidad de las proteínas BRCA mediante mutaciones u otras alteraciones<sup>121</sup>.

### **1.4. Alteraciones genómicas comunes en cáncer de mama**

Como se ha descrito anteriormente, existen diversos mecanismos como la evasión de la apoptosis, la adhesión celular, proliferación, relacionados con el desarrollo del cáncer. Los genes más alterados son aquellos denominados Oncogenes, que permiten el crecimiento tumoral y expansión del cáncer; los genes supresores de tumores y los genes de reparación del daño al ADN. La alteración de estos genes puede ser debida a una predisposición genética combinada con factores ambientales, o bien pueden ser el resultado de ciertas aberraciones cromosómicas como monosomías, trisomías, translocaciones, inversiones, deleciones o amplificaciones génicas, que permiten el aumento de la inestabilidad genómica.

Las anomalías más comunes en cáncer de mama son la trisomía de cromosomas 3, 7, 8, 18, 12, 20, X y la monosomía de los cromosomas 1, 8, 9, 13, 14, 17, X, 2, 6, 18, 12, 19 y 22<sup>122</sup>. Además, desde hace años se ha observado que los cromosomas 1 y 17 presentan gran cantidad de biomarcadores indicadores de estados tumorales premalignos<sup>123-125</sup>, ya que en estos

cromosomas se localizan genes importantes relacionados con la reparación del daño al ADN y genes supresores de tumores.

La presencia de un único brazo en los cromosomas X, 17, 19 y 22 en células de tumores mamarios, se relaciona con el pronóstico y el grado tumoral. Estos cromosomas contienen genes supresores de tumores, como el gen *ODZI* en el cromosoma X (Xq23), que participa en la activación de la apoptosis; en el cromosoma 17 el gen supresor de tumores *LDOC1* (Xq23), el oncogén *ERBB2* (17q11), y los genes *TP53* (17p13) y *BRCA1* (17q21) que participan en procesos de reparación del ADN. También en esta región se ubican los genes supresores de tumores *BCPR* (17p13.3) y *NME1* (17q21.3). En el cromosoma 19 (19p13.3) están los genes supresores de tumores *PJS*, *SAFB* y en el cromosoma 22 el gen *CHK2* (22q12.1), que también contribuye a la reparación de daños del ADN y el gen supresor de tumores *EP300* (22q13). Por otra parte, el gen *BRCA2* se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12-13).

Las diferentes aberraciones cromosómicas no nos indican únicamente un grado tumoral y una evaluación del pronóstico temprana, sino que nos pueden permitir también predecir una respuesta a un tratamiento. En un estudio realizado por Climent *et al* en el año 2007<sup>126</sup>, se identificó que la deleción de la región 11q21-25 podía predecir la respuesta a quimioterapia en muestras de cáncer de mama nodo-negativas. Los datos mostraron que pacientes con la región 11q21-25 delecionada presentaban un mayor ratio de recaída en ausencia de tratamientos con quimioterapia, independientemente de otros factores clínicos, patológicos o características genéticas. Por otra parte, aquellos pacientes tratados con quimioterapia y que presentaban dicha región normal, tenían una mayor resistencia a los fármacos basados en antraciclinas.

Estudiando a fondo la región delecionada se identificaron diversos genes de cierta relevancia, destacando entre ellos el gen *TRIM29/ATDC*, presente en la sublocalización cromosómica 11q23.3, como posible candidato relacionado con la recaída y resistencia a los fármacos.

### 1.5. *TRIM29* (Tripartite Motif Containing 29)/ *ATDC* (Ataxia-telangiectasia group D)

El gen *TRIM29* pertenece a la familia de proteínas TRIM (Tripartite Motif), caracterizadas por presentar múltiples dedos de zinc y cremalleras de leucina, permitiendo a *TRIM29* formar tanto homo como heterodímeros. Este gen se ha visto relacionado con una alta variedad de tipos de cáncer, sin embargo, su función puede depender del tipo celular, el nivel de expresión, modificaciones postraduccionales o compartimentación.

#### 1.5.1. Familia proteínas TRIM

Los miembros de la familia de TRIM se caracterizan por ser subunidades E3 del complejo de ubiquitin ligasa celular, debido a la presencia del dominio RING en su estructura. A pesar de ello, no todas las proteínas TRIM vienen definidas por esta función, ya que no todas presentan dicho dominio<sup>127</sup>. Hasta la fecha se han definido aproximadamente 70 miembros de la familia TRIM diferentes, tanto en humanos como su homólogo en ratones. Muchos de los miembros TRIM se expresan en grupos (*clusters*) en diferentes partes del genoma<sup>128</sup>.

Las proteínas TRIM se caracterizan por presentar motivos de unión de zinc, llamados cajas-B, y dominios de regiones en espiral asociadas. Las proteínas TRIM pueden clasificarse en diferentes subfamilias según su estructura<sup>129-131</sup>, y están implicadas en un amplio rango de funciones biológicas, así como también con diversas condiciones patológicas, como problemas en el desarrollo, enfermedades neurodegenerativas, infecciones virales y cáncer<sup>128,130,132-134</sup>. Muchos miembros de la familia TRIM están relacionados en procesos de regulación transcripcional, proliferación celular, apoptosis..., presentando una clara relación con la carcinogénesis y progresión en enfermedades neoplásicas<sup>128</sup>.

### 1.5.2. *TRIM29/ATDC*

La AT (ataxia telangiectasa), es una enfermedad genética recesiva que causa deficiencias inmunológicas, degeneración neurológica, problemas en el desarrollo y una alta incidencia de padecer cáncer<sup>135</sup>. Los pacientes con AT presentan una alta sensibilidad a radiaciones ionizantes, problemas en la recombinación del ADN y en la funcionalidad correcta del ciclo celular. El gen *ATDC* (ataxia telangiectasia group D-complementing), localizado en la región 11q23<sup>136</sup>, ha sido identificado como uno de los genes supresores de células mutantes en pacientes con AT<sup>134,137</sup>. El gen *ATDC*, también conocido como *TRIM29* presenta elementos estructurales propios de la familia TRIM, pero carece del dominio RING, lo que conlleva que no presente actividad como subunidad E3 del complejo ubiquitin ligasa, presentando funciones más relacionadas con la protección frente al daño del ADN<sup>134</sup>.

En el año 1992, el grupo de Kapp L.N. *et al*<sup>135</sup> describió por primera vez este gen, empezando a especular sobre la función del gen *ATDC* en la reparación del ADN dañado por irradiación. En años posteriores, en 1994 el grupo de Hosoi Y. *et al*<sup>138</sup>, observó que el nivel de expresión de *ATDC* era independiente de la irradiación en los tejidos y en las líneas celulares, pero se observaba una alta expresión en múltiples tejidos. Más tarde, en 1994, el grupo de Carter S.L. *et al*<sup>139</sup> demostraba que el microsatélite (D11S528), que mapea justo en el centro de la secuencia genómica de *TRIM29*, presentaba una pérdida de heterocigosidad (LOH) en pacientes con cáncer de mama del 39%, sugiriendo que el gen presente en esta región podría presentar una posible función como gen supresor de tumores. Durante el mismo año Murnane J.P.<sup>140</sup> describió que el gen *ATDC* actúa indirectamente suprimiendo la radiosensibilidad en aquellas células que lo expresan.

Recientemente se ha visto que el gen *TRIM29* podría ser útil en el diagnóstico de varios tipos de cáncer como mama, próstata, páncreas, pulmón y carcinoma de células escamosas del esófago. Se ha relacionado su presencia en procesos de carcinogénesis en algunos tumores, y de protección en otros,

## 1. Introducción

estableciendo *TRIM29* como un posible biomarcador importante y una diana de tratamiento en diversos tipos de cáncer. Durante la última década, en múltiples estudios se ha visto que *TRIM29* presenta unos niveles altos de expresión en cáncer de pulmón, vejiga, tejido colorectal, ovario, endometrio y en mielomas<sup>141–146</sup>.

Este gen no presentaba únicamente diferencias en su expresión entre los diferentes tipos de cáncer, y con diferente efecto, sino que presentaba diferente expresión entre los diferentes subtipos de cáncer de mama. En el año 2001, Sorlie T. *et al*<sup>55</sup> realizó la clasificación del cáncer de mama en seis subtipos diferentes en base a la expresión de ciertos genes (Luminal Subtipo A, Luminal Subtipo B, Luminal Subtipo C, Normal-like, ERBB2+, y Basal-like), entre los que estaba presente el gen *TRIM29*, apareciendo altamente expresado en el subtipo Basal-like (**Figura 6**).

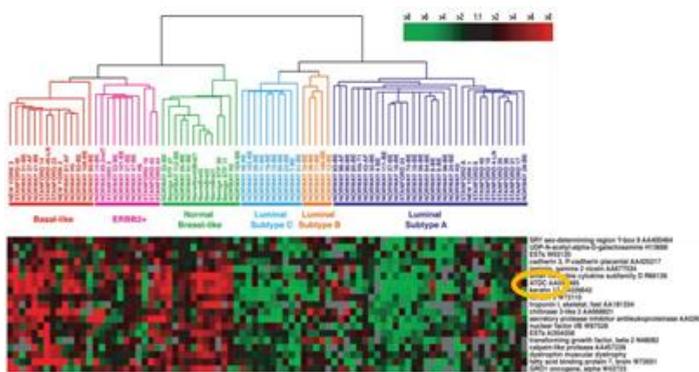
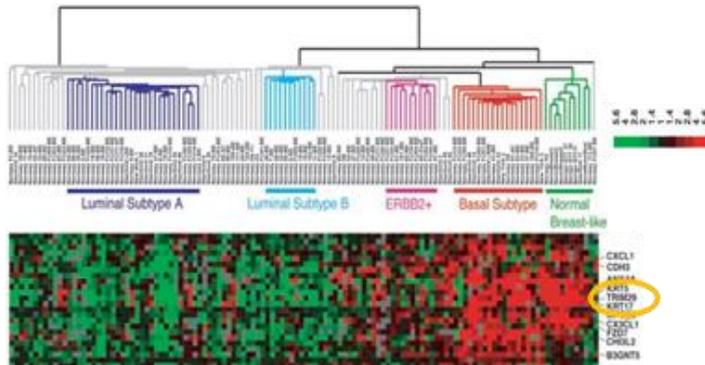


Figura 6. Clasificación del cáncer de mama según el artículo publicado en 2001 por Sorlie *et al.* donde tumores de cáncer de mama eran subclasificados en seis subtipos diferentes. En esta subclasificación aparecía el gen *ATDC* (*TRIM29*) como uno de los genes implicados en dicha subclasificación tumoral.

Dos años más tarde, en 2003, una publicación de la misma autora <sup>54</sup> demostraba con otras bases de datos independientes la confirmación de cinco de los seis subtipos anteriormente descritos (Luminal A, Luminal B, ERBB2+, Normal-like y Basal-like), donde también aparecía que el gen *TRIM29*, siendo uno de los genes que clasificaba para el subtipo Basal (**Figura 7**).



**Figura 7.** Validación de la subclasificación de los tumores de cáncer de mama en seis subtipos presentada por Sorlie *et al.* en 2003, donde el gen *TRIM29* seguía teniendo un papel importante.

### 1.5.3. Funciones

Durante los últimos años se han visto resultados contradictorios en cuanto a la funcionalidad del gen *TRIM29*, ya que según el tipo tumoral en el que se estudie, puede ejercer como oncogén, promoviendo el crecimiento tumoral, migración e invasión de las células cancerosas, o por el contrario también presentar cualidades de gen oncoprotector, tal y como describimos en la **Figura 8**.

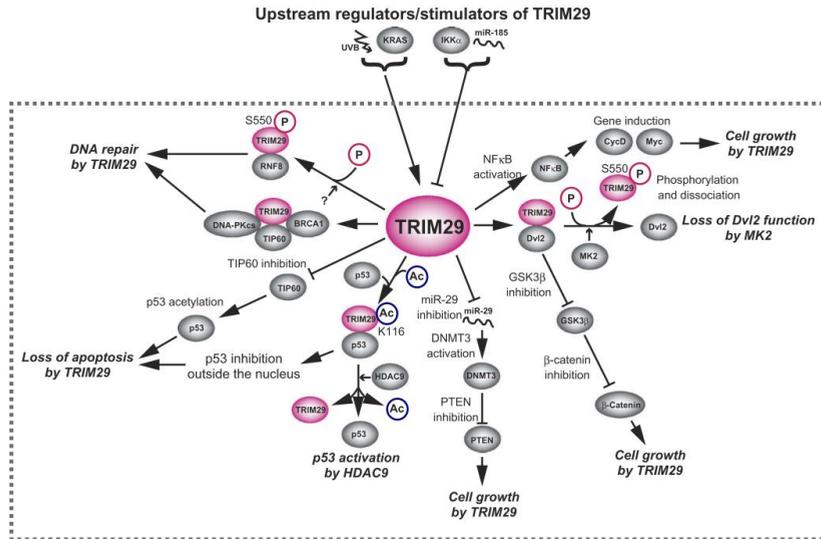


Figura 8. Funciones moleculares y biológicas de TRIM29.

### 1.5.3.1. Función oncogénica

En primer lugar se ha visto que TRIM29 regula la localización subcelular de p53, exportándolo fuera del núcleo, impidiendo que pueda realizar su función, siendo este proceso regulado por modificaciones postraduccionales, como acetilaciones de TRIM29<sup>147,148</sup>. Por otra parte, TRIM29 regula también indirectamente a p53 a través de la regulación de TIP60<sup>149</sup>, promoviendo la degradación del mismo, lo que reduce la acetilación de p53, produciendo finalmente en una inestabilidad genómica que se traduce en un aumento de la proliferación celular.<sup>128,134,147</sup>

De manera más específica, se ha encontrado que TRIM29 es un regulador positivo de la ruta de señalización canónica Wnt en cáncer de páncreas. Diversos análisis mediante inmunohistoquímica han demostrado que la expresión de TRIM29 es más alta en muchos cánceres pancreáticos invasivos, debido a la inducción de la expresión por parte del oncogén KRAS<sup>150</sup>, correlacionado con la expresión de β-catenina<sup>151</sup>. TRIM29 actúa estabilizando la proteína Dvl2, inhibiendo la glicógeno quinasa sintasa 3β

(GSK3 $\beta$ ) e incrementando por lo tanto los niveles de  $\beta$ -catenina activa, que activa los genes regulados por el complejo  $\beta$ -catenina/TCF<sup>151</sup> y la MAPKAP quinasa 2 (MK2) que fosforila la Ser550 de TRIM29, produciendo al final la disociación de TRIM29 y Dvl2<sup>152</sup>. En otros estudios se ha visto también que la activación de la  $\beta$ -catenina esta seguida por la inducción de una transición epitelio-mesenquimal (EMT)<sup>150</sup>.

Diversos estudios demuestran que la expresión de *TRIM29* también está relacionada con un grado histológico pobre, gran tamaño tumoral, invasión tumoral y metástasis en nodos linfáticos en cáncer gástrico<sup>153</sup>, sirviendo como biomarcador para este tipo de cáncer<sup>128</sup>.

*TRIM29* es un gen diana del miR-185, por lo que su expresión vendrá mediada por los niveles de este micro, de manera que la sobreexpresión de miR-185 disminuirá los niveles de *TRIM29* y por lo tanto los niveles de la ruta de señalización Wnt<sup>134</sup>.

En cáncer de pulmón, *TRIM29* regula positivamente a c-Myc y la ciclina D mediante la activación previa de la ruta NF- $\kappa$ B, pero de manera independiente a la ruta de señalización canónica Wnt<sup>154</sup>. La reducción del enzima IKK $\alpha$  produce un aumento de los niveles de expresión de *TRIM29* en tumores de células escamosas de pulmón, ya que se ha visto que IKK $\alpha$  regula de manera negativa la expresión de *TRIM29* a nivel epigenético<sup>155</sup>.

Por otro lado, *TRIM29* está muy expresado en cáncer de vejiga, y actúa suprimiendo el miR-29, con la consiguiente regulación positiva de la ADN metiltransferasa 3 (*DNMT3*). Dicha *DNMT3* silencia finalmente a *PTEN* a través de la metilación de este gen regulador<sup>156</sup>. Por ello podemos decir que *TRIM29* también presenta función a nivel del epigenético. Estudios recientes también encontraron que la sobreexpresión de *TRIM29* en líneas celulares de vejiga aceleraba la progresión del ciclo celular y la proliferación, ya que aumentaba los niveles de la ciclina E y ciclina D1. Además, le confería resistencia a tratamientos basados en cisplatino, disminuyendo la apoptosis

## 1. Introducción

---

celular, debido a que aumentaba en gran medida los niveles de Bcl-2 y activaba la ruta de NF- $\kappa$ B y la proteín kinasa-C<sup>157</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que la expresión de *TRIM29* era más elevada en aquellas células tumorales tiroideas, comparándolas con tejido normal. Además, la sobreexpresión de *TRIM29* fue relacionada con un peor pronóstico y con una supervivencia media menor que aquellos tumores que presentaban niveles bajos de *TRIM29*<sup>158</sup>.

En el carcinoma nasofaríngeo se encontró que la expresión de *TRIM29* estaba directamente correlacionada con el tamaño tumoral, el estadio clínico y la metástasis. En este tipo de carcinoma, *TRIM29* está regulado a través de dos miRNA (miR-335 y miR-15b), infraexpresados en muestras clínicas y líneas celulares. El aumento de *TRIM29* induce proliferación, transición epitelio mesenquimal (EMT) y metástasis a través de la ruta de señalización PTEN/AKT/mTOR<sup>159</sup>.

También se ha encontrado que la alta expresión de *TRIM29* en cáncer cervical está relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad y con una supervivencia media más corta. La sobreexpresión de este gen provoca un aumento en la expresión de E-cadherina, pero una disminución de los niveles de N-cadherina y  $\beta$ -catenina, lo que indica que puede estar implicado en la transición epitelio mesenquimal en cáncer cervical. En este estudio se demuestra que *TRIM29* promueve el crecimiento y progresión tumoral a través de la activación de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina. Por ello, *TRIM29* puede considerarse un potencial biomarcador de pronóstico y una diana terapéutica para cáncer cervical<sup>160</sup>.

Por último, se observó en cáncer colorectal que *TRIM29* estaba regulado positivamente y aparecía asociado con una baja supervivencia media de los pacientes. La inhibición de *TRIM29* producía una disminución tanto en la migración, invasión, como en la proliferación de las células tumorales y de la expresión de sus proteínas relacionadas. Además se vio también que los

niveles de fosforilación de JAK2 y STAT3 se vieron reducidos al disminuir los niveles de TRIM29 en las células cancerígenas colorectales<sup>161</sup>.

### 1.5.3.2. Función oncoprotectora

En los diversos estudios realizados durante los últimos años, se ha demostrado que el gen *TRIM29* tenía un efecto completamente opuesto entre los tumores de cáncer de mama y tumores de tejidos como pulmón, vejiga o páncreas. En este caso *TRIM29* presentaba un papel oncoprotector, tal y como se demuestra en diversos artículos<sup>162-165</sup>.

La expresión de *TRIM29* aumenta o disminuye el poder de invasión celular, según el tejido que se observe. Aunque se ha estudiado mucho el perfil oncogénico de *TRIM29*, los mecanismos moleculares por los cuales regula negativamente la carcinogénesis están todavía en proceso de estudio<sup>134</sup>. Se ha visto que la región promotora de *TRIM29* aparece hipometilada en células normales del tejido mamario, e hipermetilada especialmente en células más proliferativas del subtipo Luminal B. La expresión de *TRIM29* en cáncer de mama se correlacionaba con los diferentes subtipos según la clasificación mediante PAM50<sup>166</sup>.

*TRIM29* también presenta una regulación mediante miRNAs en el tejido mamario. Una prueba de ello es el estudio donde se demuestra que *TRIM29* es una clara diana de acción del miR-761. Este miRNA se encuentra sobreexpresado en tejido mamario tumoral y de manera más específica en aquellos tumores TN. La sobreexpresión de miR-761, que produce una disminución de los niveles de expresión de *TRIM29*, provoca un aumento en la proliferación celular, formación de colonias, migración e invasión<sup>162</sup>.

Una aberración en los mecanismos de regulación, ya sea debido a hipermetilaciones del promotor, sobreexpresión de algunos miRNA o por otros mecanismos explicados anteriormente, se produce un cambio en los niveles de

## 1. Introducción

---

*TRIM29*, provocando un aumento de la movilidad celular, invasividad y proliferación, así como un aumento de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (EMT). En este caso se observó que la disminución de *TRIM29* estaba relacionada con un aumento de la expresión de *TWIST1*. Por ello, la falta de *TRIM29* le confiere a la célula características de agresividad celular, llegando a la conclusión de que *TRIM29* presentaba un carácter oncoprotector<sup>163</sup>.

Diversos estudios han demostrado que el papel oncoprotector de *TRIM29* no solo es característico de unos pocos subtipos de cáncer de mama, sino que está presente en todos ellos. Se encontró que *TRIM29* tenía un papel oncoprotector tanto en líneas celulares no tumorales como en MCF10A RE-/TRIM29+, e invasivas como MCF7 RE+/TRIM29-. Mientras, el silenciamiento de *TRIM29* en las células normales producía una transformación maligna, incrementando la proliferación, crecimiento, invasión y migración; la introducción de la expresión de *TRIM29* en las células MCF7 producía una reversión del fenotipo agresivo. En este estudio se vio que la probabilidad de recaída era mayor en aquellas mujeres premenopáusicas no tratadas con quimioterapia neoadyuvante, y que no presentaban expresión de *TRIM29*, mientras que este efecto no se observó en mujeres postmenopáusicas<sup>164</sup>.

El poder oncoprotector de *TRIM29* no se ha encontrado únicamente en tumores mamarios, sino que se ha visto en algunos estudios de células basales de la próstata. Las células basales normales presentan expresión de *TRIM29*, mientras que las células tumorales no presentan expresión alguna del mismo. En este estudio se definió a *TRIM29* como un buen biomarcador de cáncer de próstata<sup>134,165</sup>.

Por estas razones, el gen *TRIM29* podría ser considerado como un biomarcador de buen pronóstico en los diversos subtipos de cáncer de mama, pudiendo ser incluido dentro de los test de pronóstico tumoral. Por otra parte, en aquellos casos en los que *TRIM29* presenta un papel oncogénico, podría

considerarse utilizarlo como diana terapéutica para evitar procesos que provoquen un peor pronóstico del paciente como la transición epitelio mesenquimal, la migración a otras regiones del cuerpo, la invasión a otros tejidos diferentes de donde surge el tumor y un crecimiento tumoral rápido.

Todavía quedan por conocerse múltiples mecanismos de acción de *TRIM29* a través de los cuales le confieren una función oncoprotectora. Tal y como se ha visto en algunos estudios previos, *TRIM29* podría ser un gen importante en la regulación de características oncogénicas en tumores TN, por ello, en el presente trabajo se va a profundizar en el estudio de *TRIM29* tanto en tumores, como en muestras humanas, que puedan elucidar los mecanismos de acción y nuevas implicaciones de *TRIM29* como gen oncoprotector en el subtipo TN.



## ***2. Hipótesis y objetivos***



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

La resistencia de ciertos tumores de cáncer de mama frente a tratamientos convencionales como taxanos o quimioterapia es uno de los principales problemas en el tratamiento de algunos subtipos tumorales como triples negativos, aumentando el riesgo de recaída de la enfermedad. Esta mayor resistencia o sensibilidad a los fármacos en tumores podría deberse, entre otros, a cambios genómicos en las células tumorales.

La base de la presente tesis doctoral surge a partir de los resultados preliminares de nuestro grupo publicados en 2007 en la revista *Cancer Research*<sup>126</sup>. En este estudio se observó que aquellos pacientes no tratados con quimioterapia, la delección de la región 11q23.1-11q24.1 se asoció de manera independiente con la recaída de la enfermedad, mientras que, en pacientes tratados con quimioterapia, la delección de la región cromosómica mencionada no presentaba asociación ninguna con la recaída.

El hecho de que la delección de una región cromosómica importante del cromosoma 11q tuviera un comportamiento significativo, promoviendo la efectividad del fármaco en aquellas pacientes que lo presentaban delecionado, nos sugería la existencia de elementos implicados en procesos de protección de la célula frente a daños y estrés producido por Doxorubicina.

### 2.2. Objetivo principal

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es estudiar el estado genómico del gen *TRIM29*, presente en la región cromosómica 11q23.3, con la finalidad de explicar los cambios en la respuesta celular frente a tratamientos con antraciclinas y en procesos de migración y proliferación.

#### 2.2.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la presencia de alteraciones genómicas en *TRIM29*, situado en la región cromosómica 11q23.3, y las implicaciones de tales alteraciones en la diferencia de expresión del gen en líneas celulares y en pacientes.
  - 1.1. Estudiar la relación de *TRIM29* con genes relacionados con procesos oncogénicos.
  - 1.2. Valorar la implicación de *TRIM29* en procesos de migración y proliferación, en modelos de líneas celulares.
2. Determinar el mecanismo de resistencia frente al tratamiento con fármacos basados en antraciclinas como Doxorubicina.

### ***3. Material y métodos***



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Análisis de ácidos nucleicos

Para realizar el análisis de los ácidos nucleicos, tanto para observar la expresión de genes, como para el *Copy Number Variation*, primero se procedió a la extracción tanto de ADN como de ARN con los kits correspondientes, y posteriormente a su análisis mediante experimentos de PCR cuantitativa.

##### 3.1.1. Extracción de ADN de células y tejidos

La extracción de ADN a partir de líneas celulares y tejidos se realizó siguiendo los pasos del kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (#69504, Qiagen). Antes de empezar con la extracción se añadió en los buffers AW1 y AW2 la cantidad necesaria de etanol, según se indicaba en las instrucciones del kit comercial. Además, se procedió a atemperar el termobloque a 56°C (Thermomixer Comfort, Eppendorf).

Para extraer ADN a partir de células, empezamos recogiendo las células de las placas Petri P100 en el momento en el que estaban con una confluencia del 90% con la ayuda de un rascador de células, añadiendo previamente PBS frío. Seguidamente se recogieron las células en un eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm ( $\approx 450$  g). Una vez recogidas, se eliminó el PBS anterior y se añadieron 200  $\mu$ L de PBS atemperado y 20  $\mu$ L de proteinasa K. Para evitar presencia de RNA en la muestra final, se añadieron 4  $\mu$ L de RNasa A (100mg/mL), se mezcló la mezcla e incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Para extraer ADN a partir de tejido, se empezó cortando 25 mg de tejido en pequeños trozos que se situaron en tubos de microcentrífuga. De manera opcional, y para una mayor comodidad y rapidez en el protocolo, se puede utilizar el homogeneizador TissueLyser o el disruptor TissueRuptor de Qiagen. Una vez dispuesto el tejido en los tubos, se añadieron 20  $\mu$ L de

### 3. Material y Métodos

---

proteinasas K y se incubaron durante toda la noche a 56°C hasta que la muestra estuvo completamente lisada. Para evitar presencia de RNA en la muestra final, se añadieron 4 µL de RNasa a (100mg/mL), y se mezcló e incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo indicado, se añadieron 200 µL de Tampón AL, se vortexó e incubó a 56°C durante 10 minutos en el termobloque previamente atemperado. Posteriormente se añadieron 200 µL de Etanol (96-100%) a la muestra y se mezcló vortexando. A continuación, se prepararon diferentes columnas (DNeasy Mini spin column) debidamente rotuladas en diferentes tubos colectores, a las que le añadimos las muestras y a las cuales, mediante los tampones proporcionados, se les realizaron diversos lavados. En primer lugar, se añadieron las muestras en las columnas y se centrifugaron a 6000 x g durante 1 minuto, para hacer pasar las muestras por la columna. Posteriormente, se descartó el tubo colector con el eludido, se añadieron 500 µL del tampón AW1 y se repitió el paso de centrifugación anterior. Después se repitió de nuevo un paso de lavado, aunque en este lugar utilizamos 500 µL del tampón AW2 y centrifugamos a 20.000 x g durante 3 minutos, para conseguir que la membrana de la columna quedara lo más seca posible.

Finalmente, se procedió a recoger el material genético, de manera que se situó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL o 2 mL y se añadieron entre 100-200 µL del tampón AE, directamente a la membrana de la columna. Se dejó incubar durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto.

La concentración y la pureza del ADN aislado de las muestras se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas, utilizando el NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

### 3.1.2. Extracción de plásmidos bacterianos

Diversos kits comerciales fueron utilizados para realizar la extracción de cromosomas o plásmidos bacterianos.

#### 3.1.2.1. Extracción de Bacterial Artificial Chromosome (BACs)

Para realizar la extracción de plásmidos de gran tamaño, los cuales fueron usados para diseñar sondas FISH no comerciales, se utilizó el kit comercial NucleoBond Xtra BAC (#740436.25, Macherey-Nagel).

Antes de empezar el protocolo se suplementaron los reactivos necesarios para llevar a cabo la extracción. En primer lugar, se añadió la RNasa A liofilizada, al tampón RES-BAC, con una concentración final de 100 µg/mL. En segundo lugar, se atemperó un baño a 65°C para posteriormente añadir el tampón mediante el cual vamos a realizar la elución de material genético.

Se empezó recogiendo la cantidad necesaria de cultivo celular bacteriano. Para ello el primer paso fue medir la Densidad Óptica del medio a 600 λ (DO<sub>600</sub>) y se determinó el volumen a extraer según la siguiente fórmula:

$$V \text{ [mL]} = 1500 / OD_{600}$$

Una vez determinado el medio a extraer se procedió a recoger centrifugando el cultivo en tubos de centrífuga de 50 mL a 4500-6000 g durante 15 minutos, habiendo atemperado previamente la centrífuga a 4°C. Posteriormente se añadieron 60 mL del tampón RES-BAC (+RNase A) al precipitado de células recogido y se transfirieron a una botella de vidrio de 500 mL. Después se añadieron 60 mL del tampón LYS-BAC, se invirtieron los reactivos, junto con las células bacterianas, unas 5 veces, o hasta que toda la solución se volviese de un tono azulado, y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante estos minutos se prepararon las columnas y se equilibraron los filtros presentes en estas mediante 30 mL del tampón EQU-BAC. Transcurridos los 5 minutos de incubación se añadieron 60 mL del

### 3. Material y Métodos

---

tampón de neutralización NEU-BAC y se mezcló la solución hasta que perdió el color azulado y quedó un color blanco ligeramente amarillento. Inmediatamente se incubó en hielo durante al menos 5 minutos.

Después del lisado de las muestras se procedió al filtraje de los restos celulares no deseados. Para ello, se cargó la solución en la columna previamente equilibrada, y esperamos hasta que la solución pasara por completo por la membrana presente en la columna. Una vez filtrada toda la solución, se lavó la columna mediante el tampón EQU-BAC, con la finalidad de recuperar material genético que hubiera podido quedar retenido en la columna. En el momento en el que terminó de pasar el tampón EQU-BAC por la columna, se eliminó el filtro y se lavó la columna añadiendo 45 mL del tampón WASH-BAC.

Finalmente, se eluyó el material genético del filtro inferior en el que se quedaron retenidos los plásmidos de gran tamaño. Para una elución más eficiente, se atemperó el tampón ELU-BAC a 65°C durante 30/40 minutos previos a este paso. Se añadieron 15 mL del tampón anteriormente mencionado y se recogió el eludido en un tubo de 15 mL al que posteriormente se añadieron 6 mL de isopropanol para precipitar los plásmidos. Posteriormente se agitó vigorosamente, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 g durante 30 minutos a 4°C. Después, se descartó el sobrenadante, se añadieron 5 mL de etanol 70% y se volvió a centrifugar a 15000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para terminar, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, y en el momento que se vio completamente deshidratado se resuspendió con un volumen apropiado de TE estéril o H<sub>2</sub>O, según la cantidad de plásmido precipitado. Para disolver completamente el plásmido, se incubó la muestra a 4°C durante toda la noche.

#### 3.1.2.2. Extracción de plásmidos de pequeño tamaño

Para realizar la extracción de los plásmidos pBABE-puro y pSUPER-puro, se utilizó el kit comercial GeneJET Plasmid Midiprep Kit (#K0482, Thermo Scientific).

Antes de empezar el protocolo se suplementaron los reactivos necesarios para llevar a cabo la extracción. En primer lugar, se añadió la RNasa A en el tampón “Resuspension Solution”. Además, también se añadieron las cantidades indicadas de isopropanol en el caso del tampón Wash Solution I y de etanol (96-100%) en el tampón Wash Solution II.

El primer paso del protocolo consistió en recoger 50 mL del cultivo bacteriano, el cual tiene que presentar un valor de  $DO_{600}$  de entre 2 y 3. Para recoger las células se centrifugó a 5000 g durante 10-15 minutos.

El precipitado se resuspendió con 2 mL del tampón “Resuspension Solution”. Seguidamente se añadieron 2 mL del tampón Lysis Solution, se invirtió 4-6 veces e incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Hay que destacar que una incubación más prolongada supondría una desnaturalización del ADN superenrollado. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 2 mL del tampón Neutralization Solution y se volvió a invertir entre 5-8 veces. Para evitar la aparición de endotoxinas se trató la solución con 0.5 mL del tampón Endotoxin Binding Reagent, se invirtió 5-8 veces e incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Después, se añadieron 3 mL de etanol 96% e invirtieron las muestras 5-6 veces. Para eliminar los restos celulares no deseados se centrifugó a 5000 g durante 40 minutos, y se transfirió el sobrenadante obtenido a otro tubo al que se le añadieron 3 mL de etanol 96%. Una vez se obtuvo la solución sin restos celulares, se añadió la solución a las columnas proporcionadas en el kit comercial. Para pasar la solución por el filtro se centrifugó a 2000 g durante 3 minutos, y se repitió dicho proceso hasta que se pudo pasar toda nuestra muestra por la columna. Seguidamente se procedieron a realizar los lavados de

### 3. Material y Métodos

---

la columna con 4 mL del tampón Wash Solution I y se volvió a centrifugar a 2000 g durante 3 minutos; se repitió el paso de lavado del mismo modo que se describió con anterioridad, pero en esta ocasión con el tampón Wash Solution II, repitiendo este paso dos veces. Finalmente se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos con la finalidad de eliminar todos los restos de alcoholes y secar el filtro de la columna.

Se eluyó el material genético de la columna mediante 350  $\mu$ L del tampón Elution Buffer que se añadió al filtro de la columna. Se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos. Finalmente obtuvimos el material genético.

#### **3.1.3. Extracción de ARN**

Para realizar la extracción del ARN se efectuó siguiendo el protocolo descrito a continuación.

##### **3.1.3.1. Extracción mediante el protocolo Trizol/Cloroformo**

Antes de empezar con el protocolo de extracción, se atemperó a 4 °C la centrífuga con la que se iban a centrifugar las muestras.

Se empezó recogiendo las células de placas Petri P100 en el momento en el que estaban con una confluencia del 90%, con la ayuda de un rascador de células y con PBS frío. Seguidamente se recogieron las células en un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm (2150 g). Se eliminó el PBS, se añadieron 500  $\mu$ L de TRIzol Reagent (#15596-026, ThemorFisher Scientific) y se homogeneizó el pellet. Inmediatamente después se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo y se agitó la mezcla de reactivos invirtiendo totalmente unas 5-6 veces. Finalmente se dejó reposando 3 minutos a temperatura ambiente.

Para recoger la fracción en la que se encuentra el ARN se centrifugó a 13000 rpm (16200 g) durante 15 minutos a 4 °C, se recogió la fracción transparente resultante de la centrifugación y se trasvasó a un tubo de microcentrifuga nuevo al que se le añadieron 250 µL de isopropanol. A continuación, se mezcló agitando el tubo y se incubó durante 2-4 h a -20°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 13000 rpm (16200 g) durante 15 minutos a 4 °C, y se eliminó el sobrenadante, obteniendo el precipitado que se corresponderá con el material genético. Para eliminar los restos de isopropanol, se realizó un lavado con 500 µL etanol 75% frío y se mezcló invirtiendo 5 veces la muestra. Para terminar, se volvió a centrifugar a 13000 rpm (16200 g) durante 15 minutos a 4°C, y se eliminó el sobrenadante, intentando dejar la menor cantidad posible de líquido. Para resuspender la muestra se utilizaron entre 20-50 µL H<sub>2</sub>O libres de RNAsas.

La concentración y la pureza del ARN aislado de las muestras fueron determinadas mediante técnicas espectrofotométricas, utilizando el NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

#### **3.1.4. PCR convencional**

##### **3.1.4.1. Diseño de oligonucleótidos**

Para realizar algunos de los estudios del presente trabajo, fue necesario el diseño de oligonucleótidos para genes específicos, tanto para observar la expresión de ciertos genes, como para observar su número de copias. Para diseñar oligonucleótidos se requieren unos requisitos específicos:

- a. El oligonucleótido debe mantener un contenido de G:C (Guanina : Citosina) entre 40 y 60 %.
- b. La secuencia de los oligonucleótidos debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- c. La longitud no debe de ser inferior a 18 y superior a 25 nucleótidos.

### 3. Material y Métodos

---

- d. Los dos oligonucleótidos del par deben de tener temperatura de fusión “Tm” cercanos, con una diferencia que no supere los 5 °C.
- e. La temperatura de fusión (Tm) debe estar comprendida entre 58 y 65 °C.
- f. Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas, así como evitar poli X.
- g. En el caso específico de oligonucleótidos para PCR a tiempo real, el resultado de la amplificación con ambos cebadores debe de ser semejante entre todos los genes que quiera observarse en el estudio, y debe de estar entre 100 y 200 pares de bases.

En nuestro caso hemos utilizado el programa llamado GenomeCompiler, el cual nos ha permitido y facilitado el diseño de los oligonucleótidos.

Como tampón para realizar las diferentes PCR clásicas se decidió utilizar el Aptamer Hot Start Master Mix (#A615, Top-Bio) debido a la facilidad que nos ofrecía en su manipulación, ya que todos los elementos para realizar la PCR estaban incluidos dentro del Tampón Aptamer Master Mix, salvo los oligonucleótidos específicos de cada gen y el ADN molde. El mix utilizado para las reacciones de PCR es el descrito en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Mezcla necesaria para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>Aptamer Hot Start Master Mix</i>	6 µL
<i>Oligonucleótido Forward (10mM)</i>	0.5 µL
<i>Oligonucleótido Reverse (10mM)</i>	0.5 µL
<i>ADN molde</i>	1 µL
<i>H<sub>2</sub>O libre de DNasa</i>	4 µL

### 3.1.5. Retrotranscripción del ARN a cADN

#### 3.1.5.1. Tratamiento con DNasa I

Para eliminar el ADN residual que ha podido extraerse junto con el ARN, se utilizó el kit de DNasa I comercial (#18068015, ThermoFisher Scientific), el cual asegura una buena eliminación del ADN presente en la muestra, ya que digiere ADN de cadena simple o doble cadena en desoxioligoribonucleótidos.

Para conseguir eliminar el ADN de las muestras de ARN se preparó una mezcla con los componentes que aparecen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Mezcla necesaria para que se produzca el tratamiento y la lisis del ADN no deseado.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>1 µg de ARN</i>	x
<i>10x DNase I Reaction Buffer</i>	1 µL
<i>DNase I, Amp Grade, 1U/µL</i>	1 µL
<i>H<sub>2</sub>O libre de RNasas</i>	8-x µL
<i>Volumen Total</i>	12 µL

Una vez preparado el mix, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se inactivó la DNasa I añadiendo 1 µL de EDTA 25 mM al resto de componentes y se calentó a 65°C durante 10 minutos. Es de alta importancia respetar los tiempos de incubación y no prolongarlos, ya que esto podría dañar el ARN.

#### 3.1.5.2. High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit

Para realizar la transcripción de ARN a cADN se utilizó el kit comercial High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit (#4368814, ThermoFisher Scientific).

### 3. Material y Métodos

---

El primer paso para hacer la retrotranscripción fue hacer un mix 2x con los componentes de la **Tabla 3** para cada una de las muestras a retrotranscribir.

**Tabla 3. Mezcla necesaria para que se realice la retrotranscripción de ARN a cADN.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
	<b>Sin inhibidor de RNasa</b>
<i>10x Tampón RT</i>	2 µL
<i>25x Mix dNTPs (100 mM)</i>	0.8 µL
<i>10 x RT Oligonucleótidos</i>	2 µL
<i>Aleatorios</i>	
<i>“MultiScribe Reverse Transcriptase”</i>	1 µL
<i>H<sub>2</sub>O libre de RNasa</i>	4.2 µL
<i>Total por reacción</i>	10 µL

La cantidad máxima aconsejada de ARN es 1 µg. Por ello, se prepararon 10 µL de ARN de las diferentes muestras a una concentración máxima de 1µg, y lo repartimos en un tubo por cada muestra. Seguidamente se añadieron 10 µL de la mezcla de componentes en cada uno de los tubos en los que estaban las muestras e inmediatamente se puso en el termociclador con un programa específico para esta polimerasa retrotranscriptasa. El programa específico empezó con un primer paso de 25°C durante 10 minutos, seguido por un segundo paso de 37°C durante 120 minutos, y finalizando con un ciclo a 85°C durante 5 minutos. Para terminar, la temperatura disminuyó hasta los 4°C para conservar la integridad de la muestra.

### 3.1.6. PCR cuantitativa

En nuestro proyecto se ha trabajado con sondas específicas de genes con tecnología TaqMan, y con elementos de unión genérica a una doble hélice como SYBR Green.

#### 3.1.6.1. TaqMan

Para realizar las reacciones con las sondas TaqMan se utilizaron las sondas de la casa comercial Applied Biosystems (#4331182, ThermoFisher Scientific) y el preparado comercial TaqMan Gene Expression Master Mix (#4369016, ThermoFisher Scientific), donde se encuentran todos los elementos necesarios. En la **Tabla 4** se detallan las sondas TaqMan utilizadas para nuestro trabajo.

**Tabla 4. Sondas comerciales TaqMan para PCR cuantitativa.**

<b>Gen</b>	<b>Código de la Sonda TaqMan</b>
<i>TRIM29</i>	Hs00232590_m1
<i>BCLL11a</i>	Hs01093197_m1
<i>CRYAB</i>	Hs00157107_m1
<i>GABRP</i>	Hs00959454_m1
<i>PROM1</i>	Hs01009250_m1
<i>SFRP1</i>	Hs00610060_m1
<i>SOSTDC1</i>	Hs00383602_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1

Mediante las sondas anteriores y la mezcla detallada en la **Tabla 5**, se realizaron las diferentes PCR a tiempo real necesarias para realizar nuestro trabajo:

### 3. Material y Métodos

---

**Tabla 5. Mezcla necesaria para realizar la PCR cuantitativa, mediante la tecnología TaqMan.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>2X Taqman "Gene Expresion Master Mix"</i>	5 µL
<i>20X Sonda TaqMan</i>	0.5 µL
<i>cADN (10-25 µg)</i>	2 µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	2.5 µL
<i>Volumen TOTAL</i>	10 µL

Finalmente, una vez preparadas las muestras con todos los elementos descritos anteriormente, se necesitó programar el termociclador QuantStudio de Applied Biosystems, con un programa específico para esta tecnología. Este programa estaba basado en dos pasos iniciales fijos que constaban de un primer paso a 50 °C durante 2 minutos y un segundo paso a 95°C durante 10 minutos para provocar la desnaturalización del cADN molde. Seguidamente se continuó con dos pasos repetidos durante 40 ciclos, mediante los que se consiguió la amplificación del cADN. Estos ciclos se basaban en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, y un paso de elongación a 60°C durante 1 minuto.

#### **3.1.6.2. SYBR Green**

En nuestro caso, el SYBR Green utilizado (PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, #A25918, ThermoFisher Scientific) contenía también la polimerasa y el tampón necesario para que pudiera llevarse a cabo la reacción. La mezcla de reacción constaba del reactivo comercial de SYBR Green, los cebadores de la región a amplificar, y el cADN o ADN molde. Diferentes ciclos de amplificación y desnaturalización fueron llevados a cabo para observar la PCR a tiempo real, observando un aumento de la fluorescencia ciclo a ciclo.

La mezcla utilizada para llevar a cabo nuestro trabajo con los diferentes pares de oligonucleótidos de los genes en estudio, mostrados en la **Tabla 6**, es la descrita en la **Tabla 7**.

**Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para los diferentes genes a estudiar con el correspondiente Forward y Reverse.**

Gen	Secuencia
<i>GAPDH</i>	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' 3'-CCAGGCGCCAATACG-5'
<i>RNASE P</i>	5'-CACGAGCTGAGTGCGTCTGTC-3' 3'-GGAACTCACCTCCCCGAAGCTCAG-5'
<i>TRIM29</i>	5'-GCCACCTATCATGTCCTGCTGG-3' 3'-GCTCAGGTCGGCCTGCACATC-5'
<i>CDH1</i>	5'-GCCACAGACGCGGACGATG-3' 3'-CCAGCCCAGTGGTGACCAC-5'
<i>CDH3</i>	5'-CCAGCACACCCTGTACGTTGAAG-3' 3'-CTCTGGACCTCAACGACTTTGG-5'

**Tabla 7. Mezcla necesaria para la PCR cuantitativa mediante la tecnología SYBR Green.**

Componente	Volumen
<i>PowerUp SYBR Green Master Mix</i>	5 µL
<i>Oligonucleótido Forward (10mM)</i>	0.5 µL
<i>Oligonucleótido Reverse (10mM)</i>	0.5 µL
<i>ADN (10-25 µg)</i>	2 µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	2 µL
<i>Volumen TOTAL</i>	10 µL

Finalmente, una vez se tuvieron todas nuestras muestras con todos los elementos anteriormente descritos, se necesitó programar el termociclador QuantStudio de Applied Biosystems, con un programa específico para esta tecnología, muy semejante al de las sondas TaqMan, pero con ligeras diferencias. Del mismo modo que con las sondas TaqMan, este programa empezaba con dos pasos fijos que estaban basados en un primer ciclo a 50 °C durante 2 minutos y un segundo ciclo a 95 °C durante 10 minutos para provocar

### 3. Material y Métodos

---

la desnaturalización del ADN molde. Seguidamente continuaba con dos pasos repetidos durante 40 ciclos, diferenciándose en el caso de SYBR Green de la  $T_m$  específica de cada de los oligonucleótidos a estudiar, mediante los que se conseguía la amplificación del ADN molde. Estos ciclos estaban basados en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, y un paso de elongación a diferentes temperaturas según la  $T_m$  de cada par de cebadores. En aquellos pares de cebadores en que la  $T_m$  fuera igual o mayor de 60 °C, la temperatura de esta parte del ciclo sería de 60 °C, pero en aquellos pares de cebadores que su  $T_m$  estuviera comprendida entre 55-60 °C, la temperatura vendría marcada por la propia  $T_m$  de cada par de cebadores. Además, en aquellos cebadores en que la  $T_m$  fuera inferior a 60 °C, se necesitaría un último paso de extensión de los fragmentos a 72 °C durante 1 minuto dentro de cada ciclo, por lo que estos pares de cebadores tendrían un paso más dentro del programa de amplificación que el resto.

#### **3.2. Análisis de proteínas**

Además de cuantificar la cantidad de proteína de un gen mediante la tecnología Western Blot, se observó la expresión según la localización subcelular mediante la Inmunohistoquímica y/o la Inmunofluorescencia de los pacientes, o líneas celulares en cultivo.

##### **3.2.1. Extracción de proteínas**

Para realizar la extracción de proteínas se partió de un cultivo celular previo en una placa Petri P100, en el que las células se encontraban entre un 80-90% de confluencia. Previamente a recoger las células, se realizó un lavado con PBS atemperado previamente a 37°C. Una vez las células estuvieron limpias y con los restos de medios lavados, se procedió a recoger las células. Se retiró el PBS atemperado y se situó la placa P100 donde se tienen las células en cultivo, encima de un recipiente con hielo. En este momento se añadió el PBS con un reactivo antifosfatasa (#P-5726, ThermoFisher Scientific), para

evitar que durante el proceso de extracción de las proteínas hubiera cambios en la fosforilación que pudiera modificar los resultados. Con ayuda de un rascador de células, se recogieron las células despegándolas del fondo de la placa. Finalmente, se recogieron las células y se pasaron a un microtubo de 1.5 mL, previamente refrigerado en hielo, para recoger las células centrifugando a 1500 rpm (2150 g) durante 10 minutos. Una vez recogidas se eliminó el PBS y se obtuvo el pellet o botón, al que se le añadió un volumen adecuado según el precipitado obtenido, del reactivo comercial RIPA Lysis and Extraction Buffer (#89900, ThermoFisher Scientific), al que previamente se le añadió un reactivo antiproteasas y antifosfatasa (#A32959, ThermoFisher Scientific). Inmediatamente se procedió a sonicar las células mediante un sonicador realizando de manera individualizada 5 ciclos de 10 segundos a una intensidad de pulso del 40%, y dejando reposar 50 segundos. Este proceso se realizó teniendo las células con el reactivo RIPA en hielo, para evitar la degradación y/o lisis de las proteínas, lo que podría producir una obtención más baja de proteína, o en peor estado, modificando nuestros resultados finales.

Para quedarse únicamente con las proteínas y descartar el resto de elementos celulares no deseados, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos, eliminando, transcurrido este tiempo, el pellet obtenido, y quedándonos con el sobrenadante. Del volumen total obtenido se recogió una pequeña cantidad, mediante la cual se procedió a cuantificar la concentración de las proteínas de manera inmediata, congelando el volumen restante a -80 °C para evitar así su degradación en el tiempo.

#### **3.2.2. Cuantificación proteica**

La cuantificación proteica se realizó mediante el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (#23227, ThermoFisher Scientific) siguiendo los pasos marcados por la casa comercial.

### 3. Material y Métodos

---

El primer paso a realizar fue crear una recta patrón mediante la cual se pudo extrapolar los resultados y observar la cantidad de proteína obtenida. Para realizar esta recta patrón se utilizó BSA con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , proporcionado por la casa comercial a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Por ello, mediante este BSA se crearon seis puntos diferentes con una concentración que variaban entre 0 y 25  $\mu\text{g}$  con un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ . Por otra parte, se utilizaron 2.5  $\mu\text{L}$  de la alícuota de la proteína recién extraída, y se diluyó en 22.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, con lo que se realizó una dilución 1:10 que tuvo que tenerse en cuenta en el momento de realizar los cálculos. Tanto los puntos de la recta patrón, como nuestras muestras se realizaron por duplicado, de manera que se obtuvo la media de los resultados obtenidos entre las réplicas. Una vez preparada la recta patrón y la dilución de cada una de las muestras, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:50 del reactivo B en el reactivo A del kit comercial a cada una de las muestras. Seguidamente se incubaron las muestras durante 30 minutos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro con una  $\lambda=595$ .

#### 3.2.3. Western Blot

El primer paso para empezar a realizar el Western Blot es el montaje de sistemas de geles de la casa comercial Clever y la construcción de un gel de poliacrilamida, con dos fases con concentraciones de gel diferentes. Por una parte, el gel inferior, con una concentración que en nuestro caso ha variado entre el 8-12% de Acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, 19:1 #1610154, Bio-Rad), y por otro lado el gel superior, con una concentración siempre menor que el gel inferior. En la **Tabla 8** se describen, a modo de ejemplo, los elementos y cantidades del gel inferior o separador; y en la **Tabla 9** se describen las soluciones y cantidades del gel superior o *Stacking*.

**Tabla 8. Mezcla del gel inferior al 12% para el análisis de proteínas mediante Western Blot.**

Componentes	Volumen final 5 mL (1 gel)
<i>Acrilamida 30%</i>	2 mL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	1.7 mL
<i>1.5 M Tris (pH 8.8)</i>	1.3 mL
<i>10% SDS</i>	50 µL
<i>10% PSA (Persulfato Amónico)</i>	50 µL
<i>TEMED</i>	2 µL

**Tabla 9. Mezcla del gel superior al 9% para el análisis de proteínas mediante Western Blot.**

Componentes	Volumen final 3 mL (1 gel)
<i>Acrilamida 30%</i>	500 µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	2.1 mL
<i>0.5 M Tris (pH 6.8)</i>	380 µL
<i>10% SDS</i>	30 µL
<i>10% PSA (Persulfato Amónico)</i>	30 µL
<i>TEMED</i>	3 µL

Una vez polimerizados cada uno de los geles, las muestras se mezclaron con tampón de carga (40% Glicerol, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue, 5% beta-mercaptoethanol), y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf).

Transcurrido este tiempo, la misma cantidad de todas las muestras (entre 25-40 µg) fueron cargadas en cada uno de los pocillos, y se separaron en diferentes carriles a 120 V durante 1.5-2 horas. Seguidamente se montó el sistema de transferencia de proteínas. Se produjo la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de PVDF (#1620177, Bio-Rad), la cual se incubó con metanol durante 10 minutos previamente a la transferencia. La transferencia se realizó a 120 V durante 45 minutos en el caso de proteínas pequeñas, o 120 V durante 1 hora y 30 minutos en el caso de proteínas con un tamaño mayor. Una vez terminada, se realizaron diversos lavados de las membranas con TBS con

### 3. Material y Métodos

---

Tween20 (#P9416-100ML, Sigma Aldrich) al 0.1% (TBS-T), y se bloqueó con una solución de TBS-T con BSA al 5% durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizaron lavados cortos con TBS-T para eliminar el exceso de solución de bloqueo. El siguiente paso fue la incubación durante toda la noche a 4 °C del anticuerpo primario, disuelto en TBS-T con un 1% BSA. Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas en Western Blot con las diluciones correspondientes se detallan en el **Anexo 1**.

Tras la incubación del anticuerpo durante toda la noche, se realizaron lavados con TBS-T, con la finalidad de eliminar excesos de anticuerpo primario. Después, se incubó la membrana con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario anti-Rabbit (#A9169-2ML, Sigma Aldrich) o anti-Mouse (#P026002-2, Dako Agilent Technologies), según el primario utilizado, en TBS-T con un 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se realizaron lavados rápidos y cortos con TBS-T, con el propósito de eliminar excesos de anticuerpo secundario.

La visualización de los resultados fue posible mediante quimioluminiscencia a través del kit comercial Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (#RPN2232, GE Healthcare Life Sciences), en el cual se mezclaron los dos reactivos proporcionados y se incubaron durante 2-3 minutos las membranas en contacto con dichos reactivos. Finalmente se procedió a visualizar los resultados mediante el equipo LAS3000, en el que se recogió la señal y las imágenes de la membrana.

#### **3.2.4. Inmunohistoquímica**

Además de un análisis cuantitativo, en muchas ocasiones también es de interés saber dónde, y de qué manera se expresan y localizan las proteínas. Por ello, mediante la inmunohistoquímica es posible saber tanto la localización

subcelular donde se encuentran, así como la intensidad de expresión de las mismas.

#### 3.2.4.1. Inmunohistoquímica de líneas celulares

Para la realización de la inmunohistoquímica de líneas celulares, previamente se cultivaron las células deseadas en las láminas comerciales con pocillos separados (#177402, Thermo Scientific Nunc Lab-Tek). Tras llegar a un 80% de confluencia, o a una confluencia que permitiera visualizar correctamente los resultados, se procedió a eliminar el medio de cultivo y lavar las células con Tris-buffered saline (TBS). Seguidamente se fijaron con una solución de metanol/acetona fría (1:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se repitieron los pasos de lavado con TBS posteriormente.

Para evitar que la peroxidasa endógena pudiera modificar o falsear los resultados, se procedió a su inhibición mediante el reactivo comercial EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako), incubando 200  $\mu$ L /pocillo durante 10 minutos. Tras el bloqueo, se realizaron tres lavados con agua destilada y se realizaron las diluciones pertinentes de cada uno de los anticuerpos primarios con el diluyente comercial EnVision Flex Antibody Diluent (Dako). Cada una de las celdillas se incubó con un volumen de 200  $\mu$ L de la dilución del anticuerpo primario (**Anexo 2**) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se llevaron a cabo tres lavados con TBS y seguidamente realizamos la incubación del anticuerpo secundario (EnVision<sup>TM</sup> + System- HRP Labelled Polymer Dual Dako), realizando la dilución previa mediante el diluyente comercial EnVision Flex Antibody Diluent (Dako). Se incubaron 200  $\mu$ L de volumen por pocillo de dilución durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con TBS.

Para revelar los anticuerpos se añadieron 200  $\mu$ L por pocillo de diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica (DAB) comercial (EnVision<sup>TM</sup> FLEX DAB+ Chromogen Dako) diluida previamente con el buffer correspondiente

### 3. Material y Métodos

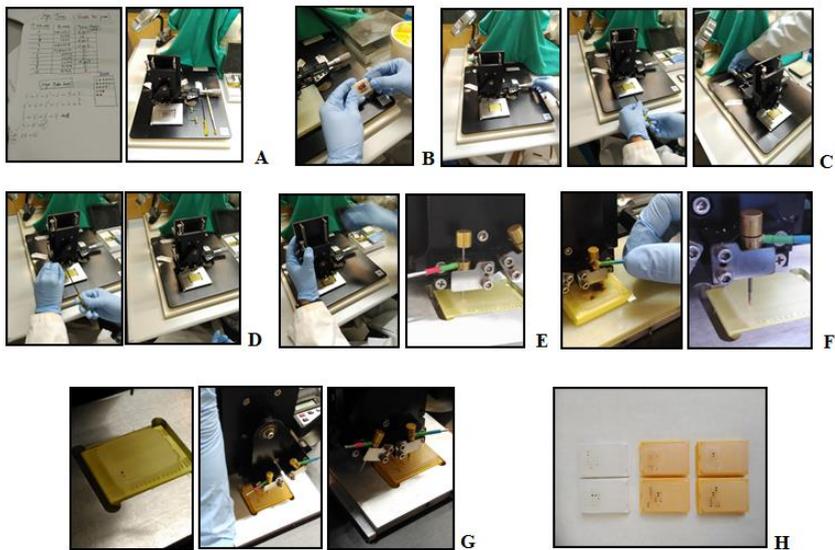
---

(EnVision™ FLEX Substrate Buffer Dako) y se incubaron durante 5-10 minutos hasta que se creyó conveniente. Para parar la reacción de revelado se realizaron lavados con H<sub>2</sub>O. Finalmente, con el objetivo contrastar los núcleos de las células se añadieron 200 µL por pocillo de hematoxilina comercial (EnVision™ FLEX Hematoxylin Dako) y se incubaron durante 5 minutos. Con el fin de tener una mejor conservación de las muestras, se procedió a deshidratarlas y montarlas con un cubreobjetos. Por ello, se empezó lavando las laminillas con soluciones con porcentajes de alcohol crecientes (70°, 80° y 90°) y finalmente con xiloles. Para terminar, se realizó el montaje de las muestras con cubreobjetos con la ayuda de Entelan, para que quedaran fijados, evitando así la degradación de las muestras con el tiempo.

#### 3.2.4.2. Diseño de los bloques de *Tissue microarray* (TMA)

El *Tissue microarray* o TMA es un bloque de parafina en el que se incluyen múltiples muestras con la finalidad de analizar un gran número de las mismas, en un único corte de parafina. Para ello, realizamos de manera manual la inclusión de las muestras en el bloque siguiendo una serie de pasos que se resumen en la **Figura 9**. En el primer paso se realizó un corte de 3 µm y se analizó el corte mediante una tinción con hematoxilina eosina, para determinar qué región del bloque correspondía con la fracción tumoral. Una vez acotada la región, se elaboró un bloque de parafina vacío, en el que se incluyeron todas las muestras. A continuación, se prepararon todos los elementos necesarios para confeccionar el bloque (**Figura 9.A**). Seguidamente, se fijó el bloque en la base del utensilio utilizado para hacer los TMAs (**Figura 9.B y C**). Para desplazar los perforadores a la distancia deseada, separando cada uno de los cilindros entre 1 y 2 mm entre sí, se colocaron todos los medidores de desplazamiento presentes a 0 mm. De esta manera, gracias a la medición entre los cilindros de muestra, se consiguió que las muestras quedaran equidistantes entre ellas.

Mediante un sistema de dos perforadores tubulares basculante, específicamente preparado en el utensilio para realizar los TMAs (**Figura 9.D**), se hicieron surcos de 1 mm de diámetro con uno de los cabezales en el bloque vacío, vaciando la parte donde se había perforado que es donde se quería incluir las muestras, y mediante el otro cabezal ligeramente más grande, se cogió un cilindro de la muestra que se quería añadir al bloque del TMA. Gracias a que el sistema de perforadores es basculante, se pudieron ir cambiando e incluyendo los cilindros dentro del bloque a una distancia determinada definida por los desplazadores anteriormente mencionados (**Figura 9.E**). Para incluir la muestra, únicamente se tuvo que insertar dentro del hueco que se había hecho mediante el primer perforador, el tubo de muestra que se realizó y estaba presente dentro del segundo (**Figura 9.F**). Estos pasos fueron repetidos múltiples veces (**Figura 9.G**) hasta que se consiguió tener entre 15-20 muestras dentro del bloque (**Figura 9.H**). Para asegurarse que los resultados obtenidos eran fiables, se hicieron duplicados de cada una de las muestras.



**Figura 9.** Construcción del bloque de TMA a partir de tumores de mama incluidos en parafina.

### 3. Material y Métodos

---

Terminado el diseño de los TMAs e incluidas las muestras dentro del bloque, con la ayuda de un porta, se presionó la superficie para que los cilindros para que quedaran todos a la misma altura. Para finalizar, se incubó el bloque de parafina a 37 °C durante 1-2 horas para que los cilindros incluidos y el bloque se fusionaran, quedando bien fijados los tubos al bloque.

Para finalizar, se realizó un corte de este bloque y se repitió la hematoxilina para asegurar que aquello que se cogió de los bloques de tejido, era fracción tumoral. A continuación, los cortes de TMAs se trataron de la misma manera que si fueran cortes de tejidos completos.

#### 3.2.4.3. Inmunohistoquímica de tejido y TMAs

En el caso de los TMAs, tras la realización de los cortes de un tamaño de 3 µm con el micrótopo, se desparafinaron en estufa a 37°C durante un periodo de 24 h. A continuación, con el fin de hidratar las muestras se pasaron por una solución de xilol concentrada, donde se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguidamente se pasó por xiloles a una concentración más baja. Posteriormente las muestras se pasaron por alcoholes gradualmente con menos porcentaje de EtOH (90°, 80° y 70°), lavándolos al final con agua destilada.

Una vez finalizada la desparafinización de las muestras, se procedió al desenmascaramiento antigénico durante 30 minutos mediante calor con autoclave utilizando tampón *low*, específico para TRIM29. Finalmente se rodearon las preparaciones con sigmacote, para que la solución con los anticuerpos quedara retenida en la región del porta deseada.

Los marcadores de interés fueron estudiados, tanto mediante anticuerpos comerciales de manera manual, como mediante un sistema automatizado con marcadores puestos a punto, utilizados en la rutina de los análisis clínicos de anatomía patológica (**Anexo 3**). En el caso de los

marcadores que se realizaron manualmente, como es el caso de TRIM29, el procedimiento que se siguió fue el mismo que el detallado en el apartado anterior de Inmunohistoquímica de las líneas celulares. La única diferencia de este protocolo con el de la inmunohistoquímica de líneas celulares fue que, en lugar de añadir 200  $\mu\text{L}$  de dilución del anticuerpo por pocillo, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  por porta. Aunque en el caso de TMAs, fuera una superficie mayor, mediante el sigmacote se consiguió que la solución de anticuerpos y reactivos quedara retenida en la región exacta donde se encontraba la muestra a estudiar.

Para el resto de marcadores estudiados, el proceso de la inmunohistoquímica se realizó de forma automatizada mediante el sistema de inmunotinción Ventana de Roche. Estos fueron puestos a punto por las casas comerciales para el día a día del diagnóstico de pacientes, ofreciendo grandes ventajas, tanto por la rapidez como por la facilidad de la realización de la técnica. Los marcadores utilizados para muestras humanas, mediante el sistema de inmunotinción Ventana de Roche, se indican en el **Anexo 3**.

#### 3.2.5. Inmunofluorescencia

En la realización de la inmunofluorescencia de líneas celulares, el primer paso fue semejante al de la inmunohistoquímica. Se empezó cultivando las células deseadas en los portas comerciales con pocillos separados (#177402, Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™). Tras llegar a un 80% de confluencia, o a una confluencia que permitiera visualizar correctamente los resultados, se procedió a eliminar el medio de cultivo y lavar las células con Tris-buffered saline (TBS). Seguidamente se fijaron con una solución de metanol/acetona fría (1:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente, repitiendo los pasos de lavado con TBS posteriormente.

Una vez terminados los lavados, se realizó la dilución 1:100 del anticuerpo primario de TRIM29 (sc-1613, Santa Cruz Biotechnology) con el diluyente comercial EnVision Flex Antibody Diluent (Dako) y se incubaron

### 3. Material y Métodos

---

200 µL de la dilución del anticuerpo primario, en cada una de las celdillas deseadas, durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con TBS y se realizó la dilución 1:500 del anticuerpo secundario con elementos fluorescentes conjugados Alexa Fluor 594 (donkey anti-goat IgG) (#A11058, ThermoFisher Scientific) en el diluyente comercial EnVision Flex Antibody Diluent (Dako). Se incubaron 200 µl de la dilución del anticuerpo secundario por pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente, pero al ser un elemento fluorescente, en este caso se tuvo que realizar la incubación en oscuridad. Transcurridos los 30 minutos de incubación se realizaron los últimos tres lavados con TBS y tres lavados con agua destilada para conseguir eliminar las sales residuales. Para terminar, las células fueron montadas directamente con DAPI II Counterstain (Abbot molecular Inc.), para teñir los núcleos de azul y para facilitar su estudio y análisis. Se cubrió el porta con un cubre para poder observar la muestra con aceite de inmersión en el microscopio de fluorescencia visualizar adecuadamente las muestras.

#### **3.3. Cultivo celular**

##### **3.3.1. Líneas celulares**

Las 59 líneas celulares utilizadas en los diferentes apartados de este trabajo fueron cedidas por el grupo del Dr. Balmain y del Dr. Gray, y son resumidas en el **Anexo 4**.

##### **3.3.2. Reactivos, condiciones y protocolos de cultivo**

Todas las células fueron cultivadas siguiendo las condiciones estándar de cultivo a 37 °C en un incubador saturado de humedad y con un flujo continuo de aire con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron en una cabina de flujo laminar y bajo condiciones de completa esterilidad.

Las células fueron cultivadas con los medios de cultivo comerciales RPMI 1640 o DMEM, según cada línea celular, y fueron suplementadas con un 10 % de Suero Bovino Fetal, y con un 1 % del combinado de antibiótico Penicilina/Estreptomicina. Aquellas líneas celulares transfectadas con los constructos pSuper y pBABE se crecieron con los medios previamente descritos y con el antibiótico selector de las células portadoras del plásmido llamado Puromicina al 1 % (1 mg/mL), de manera que únicamente aquellas células que presentaban el plásmido crecían, seleccionando así las infectadas correctamente.

#### **3.4. Hibridación “in situ” fluorescente (FISH)**

##### **3.4.1. FISH en líneas celulares**

Para estudiar el estado de un gen en las líneas celulares en las que se va a realizar la mayor parte de nuestros experimentos, se prepararon las líneas y las sondas necesarias para realizar el estudio, tal y como se detalla en los siguientes puntos.

##### **3.4.1.1. Preparación y fijación de las muestras**

A partir de un medio de cultivo con un 70-80% de confluencia se prepararon las células para poder visualizar los cromosomas en un estado de metafase. Por ello se empezó añadiendo 100  $\mu$ L del reactivo comercial KaryoMAX Colcemid Solution a un medio de cultivo de líneas celulares adherentes donde, previamente, se cambió el medio de cultivo por medio nuevo y con los suplementos correspondientes de cada línea celular. Las células se incubaron durante 5-6 horas con este reactivo en condiciones estándar a 37 °C y con un porcentaje de CO<sub>2</sub> del 5%. Transcurrido este tiempo, se procedió a despegar las células de la misma manera de la que se describió en el apartado de manejo de líneas celulares. Una vez se obtuvo el precipitado de las células, se incubaron con cloruro de potasio (KCl), con la finalidad de producir un choque osmótico y romper las células. Para ello se resuspendió el

### 3. Material y Métodos

---

precipitado celular con dicho reactivo y se incubaron las células durante 15-20 minutos a 37 °C, agitando de vez en cuando para evitar el precipitado celular. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de una dilución 1:3 metanol/acético, se mezcló invirtiendo el tubo que contenía las células y se centrifugó a 1500 rpm ( $\approx 450$  g) durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadieron tantos mL de la dilución 1:3 metanol/acético como mL tenía el tubo en el que estaban las células, resuspendiéndolas posteriormente. Finalmente, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se procedió a realizar la extensión de los núcleos. Para ello, con la ayuda de una pipeta pasteur, se dejó caer un volumen adecuado de la solución con las células sobre los portas, desde una altura de uno a dos metros, de manera que, en el momento de caer los núcleos sobre el cristal, éstos se separaron suficientemente como para que los cromosomas fueran visibles de manera individual en el microscopio.

Una vez terminado, se rellenó la solución de los núcleos con la dilución 1:3 de metanol/acético hasta el volumen máximo del tubo en el que se quieren preservar y se almacenan a -20 °C, donde pueden permanecer hasta el momento en el que se quiera realizar de nuevo la extensión de los núcleos.

#### **3.4.1.2. Preparación de las sondas no comerciales**

En nuestro trabajo se estudian genes poco conocidos, y por lo tanto con sondas poco disponibles en las casas comerciales, o con un elevado precio comercial. Por ello, uno de los objetivos fue conseguir sondas que pudieran prepararse en el laboratorio con elementos convencionales, obteniendo los mismos resultados y con la misma reproducibilidad que las sondas comerciales.

#### 3.4.1.2.1. Marcaje

Para fabricar sondas no comerciales se utilizó material genético que pueda hibridar sobre la secuencia geonómica deseada BACs (del inglés Bacterial Artificial Chromosomes). Estos BACs son secuencias de material genético específicas complementarias a una región específica dentro del genoma. La forma de amplificar y obtener estos BACs a una concentración mediante la cual se pueda trabajar, se describe en los puntos 3.6.5 y 3.3.2, correspondiendo al cultivo bacteriano y a la extracción del plásmido de dicho cultivo mediante el kit comercial específico respectivamente.

Partiendo de 1 µg de BAC se pueden realizar hasta 10 hibridaciones de FISH, dependiendo de la cantidad de sonda a añadir por hibridación; siendo 100 ng de sonda la cantidad más comúnmente utilizada, pero pudiendo ser mayor en el caso de verse intensidades de fluorescencia bajas.

Para marcar de manera fluorescente el BAC, se requiere la presencia de diversos elementos indispensables, como elementos fluorescentes. Éstos, se basarán en dUTPs conjugados con fluorocromos verdes (Green dUTP, # 53202N32-050, Abbot Molecular) o fluorocromos rojos (Red dUTP, # 53202N34-050, Abbot Molecular); y por otro lado la polimerasa. En nuestro estudio elegimos la técnica de Nick Translation para realizar el marcaje. Dicha técnica se basa en realizar cortes en la cadena de ADN a través de la secuencia, dejando extremos –OH y P. A continuación se produce la incorporación del siguiente dNTP complementario a la hebra molde, uniéndolo en el extremo hidroxilo terminal creado por la polimerasa. De esta manera, la polimerasa añade dUTPs con fluorocromos conjugados presentes en la mezcla, consiguiendo crear cadenas de ADN marcadas aleatoriamente. Las diferentes cadenas creadas con los fluoróforos no son ligadas, consiguiendo unas cadenas de entre 50 y 600 pares de bases a través de todo el BAC. El kit para realizar el proceso que incluye todos los elementos necesarios salvo los fluoróforos, fue el Nick Translation Kit (#53207J00-001, Abbot Molecular).

### 3. Material y Métodos

---

En la **Tabla 10** se describe el mix mediante el cual se consiguió el marcaje de la secuencia de ADN.

**Tabla 10. Mezcla de la reacción necesaria para realizar el marcaje de las sondas mediante la metodología Nick Translation.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>1 µg ADN</i>	X µL
<i>H<sub>2</sub>O Libre de Nucleasas</i>	(17.5 -X) µL
<i>0,2 mM Green dUTP/ Red dUTP</i>	2.5 µL
<i>0,1 mM dTTP</i>	5 µL
<i>0,1 mM dNTPs Mix</i>	10 µL
<i>10X Tampón Nick Translation</i>	5 µL
<i>Enzima Nick Translation</i>	10 µL
<i>Volumen Total</i>	50 µL

Cada reacción de marcaje se realizó en un microtubo de PCR y la mezcla se incubó en un termociclador durante 16 horas a 15 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo calentando la muestra a 70 °C durante 10 minutos y enfriándose posteriormente a 4 °C o en hielo.

#### 3.4.1.2.2. Precipitación

Posteriormente al marcaje de las sondas se quiso precipitar la sonda junto con varios elementos que evitaran uniones inespecíficas y que promovieran la unión específica de la sonda en la región correspondiente del cromosoma. De esta forma se evitarían falsos positivos o artefactos que pudieran alterar nuestro resultado final.

Para precipitar la sonda se añadieron por cada 100 ng de sonda 6 µg de Cot-1 Human ADN, 2 µg de ADN de esperma de salmón y un volumen de H<sub>2</sub>O hasta 10 µL. Una vez realizada la mezcla de estos elementos, se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto,

justo en el orden en el que han sido mencionados. Posteriormente a la mezcla de manera breve la solución mediante el vortex, se incubó 15 minutos en hielo. Seguidamente se centrifugó la solución a 12000 rpm durante 30 minutos con una centrifuga previamente atemperada a 4 °C. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se añadieron 400 µL de etanol 70% para realizar un lavado de la sonda. Se centrifugó de nuevo a 12000 rpm durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando el precipitado. Dicho precipitado se dejó el tiempo que se creyó necesario, en oscuridad y con un flujo de aire (a ser posible) para secar completamente la sonda precipitada. De esta forma se evitaría la presencia de alcoholes que pudieran impedir de alguna manera la unión de las sondas en la región complementaria deseada.

#### 3.4.1.3. Protocolo de hibridación

El último paso previo a la hibridación de la sonda es la resuspensión de la sonda con la cantidad de H<sub>2</sub>O que se crea conveniente, según la cantidad de sonda que se quiera utilizar para cada hibridación. Para cada una de las hibridaciones, la mezcla de hibridación debería contener los elementos descritos en la **Tabla 11**.

**Tabla 11. Mezcla necesaria para realizar la hibridación de las sondas.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>LSI/WCP Hybridization Buffer</i>	7 µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	(3-X) µL
<i>Sonda (~100 ng)</i>	X µL
<i>Sonda Centromérica CEP</i>	0.5 µL
<i>Volumen Total</i>	10.5 µL

### 3. Material y Métodos

---

Una vez se tuvo la mezcla de todos los componentes, se mezclaron con la ayuda de un vortex varias veces y se extendieron sobre cada una de las láminas con las extensiones previamente preparadas. Seguidamente se cubrió con un cubre de 22x22 y se situó la lámina en una de las placas calefactoras programables ThermoBrite (ThermoFisher Scientific). Se le dispuso un programa que constaba de un paso inicial a 73°C durante 3 minutos, mediante el cual se consiguió desnaturalizar la sonda, y un segundo paso a 37°C durante toda la noche, gracias al cual se produjo la hibridación de las sondas en la región complementaria.

Transcurridas al menos 16 horas desde el inicio de la incubación, se procedió a realizar los lavados de las láminas, con la finalidad de eliminar las sondas no hibridadas y poder visualizar y analizar nuestros resultados correctamente. Las soluciones de lavado estaban basadas en detergentes que ayudaron por una parte a eliminar uniones no covalentes y sondas no hibridadas, así como también a romper membranas citoplasmáticas y nucleares, facilitando la visualización de los resultados. Para lavar las láminas, primero se retiró el cubre de cristal dispuesto donde se depositó la mezcla de la reacción. Minutos antes de empezar con los lavados, se atemperó la solución 1 de lavado (0,4X SSC/0,3% NP40) a exactamente 72 °C, y posteriormente se incubaron las láminas durante 2 minutos sumergidas en la solución 1 a dicha temperatura. Sin sobrepasar este tiempo de incubación, se extrajeron las láminas y se dejaron enfriar sobre la bancada en oscuridad durante 1 minuto. A continuación, las láminas se sumergieron en un recipiente de cristal con la solución 2 de lavado (2XSSC/0,1%NP40) a temperatura ambiente, y se agitaron ligeramente para realizar el lavado durante 10 segundos. Finalmente, se dejaron sobre la bancada en oscuridad y una vez se creyó conveniente, se añadieron 10-15  $\mu$ L de DAPI en la región donde se había producido la hibridación y se cubrió con un cubre de vidrio de 24x60. Para terminar, se dejaron incubando las láminas 30 minutos en oscuridad antes de analizar los resultados en el microscopio de fluorescencia.

#### 3.4.2. Pintado cromosómico

El pintado cromosómico implica la hibridación de múltiples sondas a lo largo de los cromosomas, con la finalidad de marcar el cromosoma al completo, observar posibles translocaciones y determinar sobre que cromosoma se ha realizado la translocación. Para hibridar dichas sondas en la extensión de las muestras elegidas, se realizó un mix que incluía 2  $\mu\text{L}$  de tampón de hibridación, 1.5  $\mu\text{L}$  de la sonda de uno de los cromosomas que queríamos observar, en color verde, y 1.5  $\mu\text{L}$  de sonda roja para el otro cromosoma. Se mezcló bien dicho mix, y los 5  $\mu\text{L}$  totales se colocaron sobre la zona de la extensión que tuviera mejores metafases, depositando un cubreobjetos de 22 x 22 mm. A continuación, se colocó en la placa de hibridación y se programó para que estuviera 3 minutos a 73 °C, y posteriormente se mantuviera a 37 °C durante de 18 a 24 horas. Al día siguiente, se siguieron los mismos pasos que en el FISH con sondas génicas, tanto en el lavado, como en la observación de los resultados, tal y como se detalla en el punto anterior.

#### 3.4.3. Visualización de resultados

Para observar los resultados y analizar las señales obtenidas en el microscopio de fluorescencia se utilizó el software informático Isis Image Acquisition System, el cual permitió filtrar la observación de las señales por diferentes filtros de colores por separado o conjuntamente. También facilitó la visualización de aquellas muestras donde la señal era algo más débil eliminando artefactos y regulando las intensidades de la fluorescencia.

### 3. Material y Métodos

#### 3.5. Modificación celular

##### 3.5.1. Diseño y selección del pSUPER-shRNA

En el momento de elegir la secuencia del *Short Hairpin RNA* (shRNA) que sea complementaria a una región del mRNA, se tuvo en cuenta que dicha región fuera común a la mayoría de las isoformas, para poder reducir el mayor nivel de mRNA posible, ya que de lo contrario se estaría haciendo una selección de unas isoformas con respecto a otras.

Se diseñaron múltiples modelos de shARN para TRIM29, de entre los cuales, después de probar su efectividad para disminuir la expresión del gen, se eligió un constructo complementario a una secuencia del Exón 9, siendo la secuencia Forward 5'-GATCCCCGGAAACCTCTCAGTGTCTTGA TTCAAGAGATCAAGACTGAGAGGTTCC TTTTGGAAA-3', y la secuencia Reverse 5'-AGCTTTTCCAAAAA GGAAACCTCTCAGTGTCTTGA TCTCTTGAATCAAGACTGAGAGGTTCC GGG-3'. Finalmente, los enzimas utilizados para insertar el plásmido en el interior fueron HindIII y BglII.

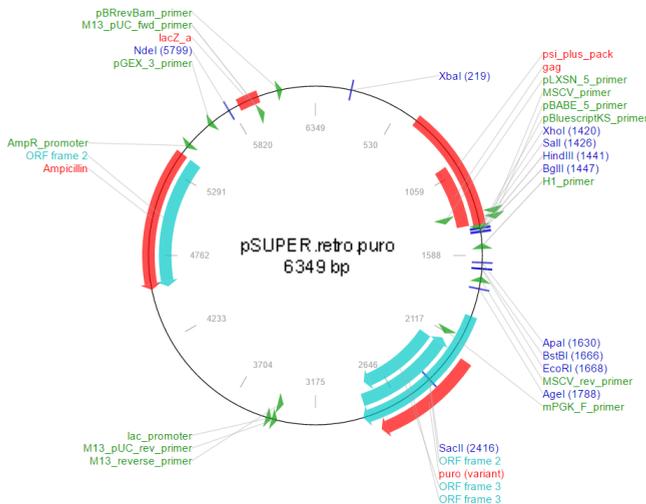
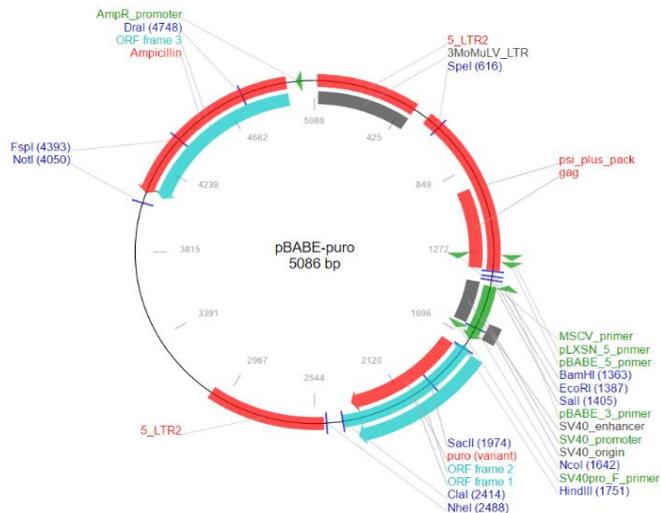


Figura 10. Esquema del plásmido pSUPER utilizado para infraexpresar TRIM29.

El vector utilizado para modificar las células y producir la infraexpresión del gen deseado fue el pSUPER.retro (**Figura 10**), con un tamaño de 6349 pb, el cual presenta resistencia a Puromicina como gen selector.

#### 3.5.2. Diseño y selección del pBABE-mARN

La sobreexpresión de genes en una célula se consigue gracias al clonaje del cADN correspondiente al mARN de una de las isoformas de dicho gen de un organismo homólogo, dentro de algún sistema que permita internalizar dicho cADN en el citoplasma, si queremos una sobreexpresión transitoria; o bien incorporarlo en el genoma si queremos una sobreexpresión estable. Además, el promotor que presente dicho gen debe tener una alta tasa de actividad para producir una alta expresión del mismo. Para facilitar el clonaje y ligación del fragmento de interés, éste debe ser diseñado con los extremos complementarios al sitio de restricción elegido al cortar el vector, de manera que los extremos del fragmento de interés encajen con los extremos del vector abierto.



**Figura 11.** Esquema del plásmido pBABE utilizado para sobreexpresar TRIM29.

### 3. Material y Métodos

---

Para producir la sobreexpresión del gen se introdujo dentro del vector una secuencia, correspondiente con el cADN de la isoforma completa de TRIM29, de un tamaño de 3018 pares de bases.

El vector utilizado para modificar las células y producir la sobreexpresión de un gen fue el pBABE (**Figura 11**), con un tamaño de 5086 pb, el cual presenta resistencia a Puromicina como gen selector.

#### 3.5.3. Clonaje del vector

El primer paso para introducir el shARN en forma de ARN de cadena simple dentro del vector consiste en aparear ambos oligonucleótidos obtenidos de manera separada. Para ello se realizó una reacción en la cual los oligonucleótidos se encuentran a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . El primer paso previo a la unión fue resuspender los oligonucleótidos liofilizados con tampón TE o con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta una concentración final de 200  $\mu\text{M}$ . Para dicha unión se precisó de una mezcla de ciertos elementos necesarios para que pudiera llevarse a cabo la reacción. Además, se preparó también el tampón de unión de oligonucleótidos al 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0; 1 M NaCl), el cual proporcionó las condiciones de medio necesarias para dicha unión. La mezcla utilizada para la reacción de unión fue la descrita en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Mezcla necesaria para realizar la unión de los oligonucleótidos correspondientes.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>ADN "Top strand" (200 <math>\mu\text{M}</math>)</i>	5 $\mu\text{L}$
<i>ADN "Bottom strand" (200 <math>\mu\text{M}</math>)</i>	5 $\mu\text{L}$
<i>10X Tampón de unión de oligos</i>	2 $\mu\text{L}$
<i>H<sub>2</sub>O Libre de Nucleasas</i>	8 $\mu\text{L}$
<i>Volumen Total</i>	20 $\mu\text{L}$

Una vez se tuvieron todos los elementos preparados en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se precalentó el termobloque a 95 °C, y una vez alcanzada la temperatura, se incubó la mezcla durante 4 minutos. Transcurrido este tiempo, el tubo fue extraído del termobloque e incubado a temperatura ambiente durante unos 40 minutos, durante los cuales se produjo la unión de los oligonucleótidos. Para terminar, se diluyó una alícuota a la concentración deseada para realizar después la ligación con el vector, y se almacenó tanto la alícuota como todo el volumen de los oligonucleótidos unidos a -20 °C, hasta el momento en el que fuera a utilizarse.

El siguiente paso fue ligar el cADN o el shARN dentro del vector. Para ello, se empezó abriendo el vector por las regiones de restricción deseadas. Para este paso se necesitaron ciertos componentes esenciales, como el tampón en el cual va a producirse la reacción y los enzimas de corte deseados. Hay que destacar que en el caso en el que el plásmido quiera abrirse mediante el corte con varias enzimas de restricción, el buffer será determinado gracias a la aplicación web Double Digest Calculator dentro de la página de ThermoFisher Scientific. En algunos de estos casos, el volumen del tampón a añadir puede ser 2x o 3x, según los requerimientos de las enzimas a utilizar.

La mezcla estándar utilizada para digerir el vector fue la descrita en la **Tabla 13**.

**Tabla 13. Mezcla necesaria para realizar el corte del plásmido con enzimas de restricción con extremos cohesivos con los oligonucleótidos.**

Componentes	Reacción con 1 enzima	Reacción con 2 enzimas
<i>Tampón de reacción</i>	2 µL	2 µL
<i>Enzima restricción 1</i>	0.5 µL	0.5 µL
<i>Enzima restricción 2</i>	-	0.5 µL
<i>Plásmido 0,5-1 µg</i>	x µL	x µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	(17.5 -x) µL	(17.5 -x) µL
<i>Volumen Total</i>	20 µL	20 µL

### 3. Material y Métodos

---

La mezcla de todos los elementos fue incubada a 37 °C durante toda la noche en el termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf), para conseguir un corte completo de todo el plásmido.

Una vez transcurrido este tiempo, se cogió una pequeña cantidad de la reacción de digestión y se analizó en un gel de Agarosa al 0.8%, de manera que, si el plásmido se digirió correctamente, tenía que observarse una banda, en el caso de cortar con un enzima, o dos bandas, en el caso de haber cortado con dos enzimas.

Si el plásmido se encontrara correctamente cortado se procedería a desfosforilar los extremos mediante el reactivo FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (#EF0654, ThermoFisher Scientific). Este elemento desfosforila todos los tipos de extremos de ADN (romos, 5' y 3'-protuberantes). Para llevar a cabo esta desfosforilación se siguieron las indicaciones de la casa comercial, en la que se indicaba que tenía que realizarse la mezcla presente en la **Tabla 14**.

**Tabla 14. Mezcla necesaria para la desfosforilación de los extremos del plásmido abierto.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
<i>10X Tampón de reacción</i>	2 µL
<i>Enzima FastAP</i>	1 µL
<i>Vector (abierto) 1 µg</i>	x
<i>H<sub>2</sub>O</i>	(17-x) µL
<i>Volumen Total</i>	20 µL

Para llevar a cabo la desfosforilación, el protocolo a seguir se basa en la incubación de la mezcla de todos los elementos en el termobloque durante 15 minutos a 37 °C. Finalmente se calienta a 75 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el enzima y detener la reacción.

Después de desfosforilar los extremos y asegurarse de que no podían volver a unirse y, volver por lo tanto a la conformación circular, se realizó la ligación de los insertos con el vector, utilizando la T4 DNA Ligase (#15224017, ThermoFisher Scientific). Se sigue el protocolo recomendado por la casa comercial, en el cual se empieza realizando la mezcla de reacción de la

**Tabla 15.**

**Tabla 15. Mezcla de ligación y unión del inserto y el vector.**

<b>Componentes</b>	<b>Ligación extremos cohesivos</b>	<b>Ligación extremos romos</b>
<i>5X Tampón Ligación</i>	4 µL	4 µL
<i>Inserto : Vector</i>	Relación 3 : 1	Relación 3 : 1
<i>ADN total</i>	X (0.01-0.1 µg)	(0.1-1 µg)
<i>Ligasa T4</i>	0.1 µL	1 µL
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Hasta 20 µL	Hasta 20 µL
<i>Volumen Total</i>	20 µL	20 µL

Una vez mezclados todos los componentes se incubó en el termobloque la mezcla de ligación a una temperatura de 16 °C durante toda la noche. Finalmente, para comprobar si la ligación había sido del todo correcta, se procedió a transformar bacterias *E.coli* competentes con los productos de la ligación. Cabe destacar que los plásmidos utilizados contienen la secuencia de resistencia a ampicilina. De este modo, al crecer las bacterias en presencia del antibiótico, sólo crecerán aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido completo y por tanto presenten resistencia a la ampicilina.

#### **3.5.4. Transformación bacteriana**

La transformación bacteriana mediante plásmidos es el proceso mediante el cual conseguimos introducir los plásmidos ligados en el apartado anterior dentro de las células competentes SIG-10 5-alpha (#CMC0007, Sigma

### 3. Material y Métodos

---

Aldrich). Gracias al crecimiento de estas bacterias mediante un cultivo bacteriano estándar, se consiguió amplificar el plásmido a medida que crece el cultivo bacteriano. Al añadir el antibiótico a la placa de agar (a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ ), nos aseguramos de que sólo las bacterias transformadas con el plásmido podría resistir el antibiótico y serían capaces de crecer.

Antes del inicio del protocolo de transformación se tienen que llevar a cabo ciertos pasos para asegurar buenos resultados y una buena transformación de las bacterias con los plásmidos. En el primero de los pasos se calentó el resultado de la ligación anterior a 70 °C durante 15 minutos, antes de la transformación. Además, se prepararon previamente placas Petri con medio en agar y el antibiótico correspondiente. Por otra parte, tanto las células como los tubos de microcentrífuga en los cuales se realiza la transformación deben ser atemperados en hielo durante 20 minutos antes de ser utilizados. Para finalizar, se tuvo que atemperar el medio de cultivo inicial específico *Cloning Recovery Medium*, en el cual se desea crecer las células competentes posteriormente al choque térmico.

Una vez seguidas las instrucciones anteriores, se procedió a realizar el protocolo de transformación recomendado por la casa comercial, con algunas modificaciones después de optimizar el proceso en el laboratorio. Para empezar, se añadieron 45  $\mu\text{L}$  de las células competentes atemperadas, al tubo de microcentrífuga también atemperado. A continuación, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de reacción de ligación dentro del volumen de las células anteriormente añadido, intentando que no se formara ninguna burbuja en el momento de añadir el plásmido. Para homogeneizar un poco las células con el ADN, se pipeteó suave arriba y abajo evitando otra vez introducir burbujas. Seguidamente se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos. Durante este tiempo se atemperó el termobloque a 42 °C. Transcurridos los 30 minutos, se realizó un choque térmico, incubando las células durante 45 segundos exactamente a 42 °C y luego volviendo a incubar las células en hielo durante 2 minutos. Finalmente

se añadieron 950  $\mu\text{L}$  de *Recovery Medium* a los tubos con las células y se incubaron en el termobloque a 37 °C durante 1.5 horas en agitación a 750 rpm. Una vez finalizado este período de incubación, se sembró un volumen de 300  $\mu\text{L}$  en las placas Petri con el agar y antibiótico deseado, y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Para terminar, se seleccionaron las colonias individuales crecidas en las placas y se procedió a expandirlas en un cultivo bacteriano, para más adelante extraer el plásmido incorporado en cada caso y comprobar si contenían adecuadamente el inserto de interés.

#### **3.5.5. Cultivo bacteriano**

Los pasos y productos necesarios para realizar cultivos bacterianos se describen en los siguientes apartados.

##### **3.5.5.1. Reactivos y condiciones para el cultivo**

Para realizar el crecimiento de microorganismos, posteriores a la transformación con los vectores de interés o aquellos comerciales que ya presentan el BAC del gen deseado, se preparó el medio de cultivo bacteriano. Basado en una dilución de 20 g del producto LB Broth (Sigma-Aldrich #L3022) en 1 L de agua, posteriormente esterilizado mediante autoclave para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados.

Tanto para el caso de colonias resultantes de la transformación, como para el crecimiento de los BACs que van a ser utilizados para FISH, se realizó un precultivo. Para ello, se inoculó una pequeña cantidad de bacteria, en un volumen de 10 mL de LB con el antibiótico deseado. Este precultivo se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Tras el precultivo, se procedió a determinar si las secuencias clonadas y amplificadas eran las correctas. En primer lugar, se extrajeron los productos

### 3. Material y Métodos

---

amplificados mediante el kit de extracción de plásmidos ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research # D4015). Una vez extraídos los plásmidos, realizamos diferentes cortes con enzimas de restricción en cada uno de los casos y el resultado de las reacciones de digestión se analizó en un gel de agarosa al 0.8%. De este modo, fijándonos en los tamaños de las bandas obtenidas, podíamos saber en cada muestra, si la colonia en cuestión había incorporado o no el fragmento de interés. A posteriori, seleccionamos aquella muestra de interés que tuviera la secuencia correcta y procedimos a expandirla en un cultivo de un volumen mayor.

Con la finalidad de tener un volumen de cultivo elevado mediante el cual se podía extraer una alta cantidad de los plásmidos de interés, se procedió a inocular un volumen deseado del precultivo del día anterior. Se incubó un cultivo de un volumen de 200-300 mL durante 12-16h en matraces de 500 mL a 37°C en agitación media, y con el antibiótico deseado. Para la realización de este trabajo se utilizaron como antibióticos de selección Cloranfenicol (Sigma-Aldrich #C0378) a una concentración final de 10,2 µg/mL, y Ampicilina (ThermoFisher Scientific #11593027) a una concentración de 25 µg/mL.

#### **3.5.5.2. Condiciones de conservación y almacenaje**

Una vez obtenido un volumen deseado del cultivo bacteriano se procedió a almacenar una pequeña alícuota para futuros experimentos. Para ello se realizó un mix con aproximadamente un 20 % de glicerol al 75 % y un 80% de cultivo bacteriano en un Eppendorf. Dichas alícuotas pasaron a ser almacenadas rápidamente en a una temperatura de -81°C.

#### 3.5.6. Ensayos de transfección

El primer paso a realizar para transfectar las células con los constructos deseados fue sembrar las células en placas de seis pocillos, en las cuales se tiene optimizada la metodología. Cuando la confluencia llegó al 80%, se procedió a transfectar las células. Para ello, por cada pocillo se crearon dos mezclas A y B, en la que estaban todos los elementos necesarios. En la mezcla A se añadieron 150  $\mu\text{L}$  del medio libre de suero Opti-MEM y 2,5  $\mu\text{g}$  del plásmido ligado con el inserto, y en la mezcla B se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM y 12  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine2000 (#11668027, ThermoFisher Scientific). En el momento que se tuvieron las dos mezclas hechas, se mezclaron y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió el resultado de la mezcla gota a gota a cada uno de los pocillos, añadiendo el volumen resultante de 300  $\mu\text{L}$  totales de mezcla por pocillo a transfectar. Finalmente, se dejó incubando unos dos o tres días en condiciones de cultivo estándar a 37 °C y se observó el resultado de la transfección, mediante la expresión de GFP. A partir de este momento se procedió a analizar las células transfectadas.

#### 3.5.7. Ensayos de infección

La infección de células mediante retrovirus es la forma, mediante la cual, podemos hacer que una modificación o introducción de plásmido sea estable en el tiempo, siendo observable a lo largo de la vida útil de la línea celular deseada. Gracias a esta técnica es posible introducir plásmidos, que se integren en el genoma celular, mediante los cuales puede producirse el *Knock-down* o sobreexpresión de un gen, así como el *Knock-Out* completo. Gracias a esta estabilidad es posible observar el efecto de la modificación a lo largo de un período de tiempo indefinido.

Para poder llevar a cabo esta modificación mediante retrovirus, se consiguieron líneas celulares capaces de producir virus; mediante los cuales se

### 3. Material y Métodos

---

empaquetan los plásmidos de interés y que posteriormente infectan las células que queremos modificar, insertándose el plásmido dentro del genoma celular. En nuestro caso se utilizaron las células modificadas 293 Phoenix Amphotropic cells.

El primer paso a realizar fue la transfección de la línea celular 293 Phoenix Amphotropic cells capaz de producir virus. En el protocolo optimizado para placas de 100 mm por pocillo, se sembraron las células Phoenix Ampho con una cantidad adecuada, para conseguir un 80% de confluencia al día siguiente, y cultivadas con medio DMEM con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos.

En el momento en el que se observó que las células se encontraban en un 80% de confluencia, se procedió a realizar la mezcla para la transfección. Se añadió en un tubo 1 mL de medio Opti-MEM, 75  $\mu$ L de PEI (Sigma Aldrich # 408727), 20  $\mu$ g del plásmido de interés y 20  $\mu$ g del plásmido pCL.Ampho, que codifica para los genes de la envoltura del virus (Gag y Pol) y se mezcló brevemente mediante vórtex para que los componentes quedaran homogéneos. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente y mientras tanto, se cambió el medio de cultivo de las células por DMEM con un 2% de suero bovino fetal y sin antibióticos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añadió la mezcla anteriormente preparada que contenía los complejos DNA-lípido gota a gota sobre las células y se incubaron de 3-5 horas a 37°C en condiciones estándar de cultivo celular. Finalmente, transcurrido este tiempo, se cambió el medio y se añadió DMEM con 10% de suero bovino fetal y un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Tras esto, se dejaron las células incubando durante toda la noche. 24 h post-transfección se cambió el medio de cultivo de nuevo por medio DMEM con 10% de Suero Bovino Fetal y un 1% de antibióticos. Debido a que las células Phoenix producen los virus entre las 48 h y las 96 h post-transfección, a las 48 h siguientes se recogió el medio de cultivo que estaba presente en las Phoenix y, se añadió medio nuevo. El medio recogido, que contenía las partículas

víricas se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y el sobrenadante se filtró con filtros de 0,45  $\mu\text{M}$  y se le añadió polybrene a una concentración final de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tras esto, los virus estaban listos para infectar las células. Debido a que los retrovirus sólo infectan células que se están dividiendo activamente, las células a infectar tienen que estar en una confluencia no demasiado alta y dividiéndose de forma exponencial.

El siguiente paso fue retirar el medio de las células que se iban a infectar y añadirles el medio con los retrovirus ya centrifugados y filtrados. Las células se incubaron después durante 4 horas a 37 °C en presencia del virus, y tras este paso, se cambió de nuevo el medio por medio de cultivo fresco con los suplementos estándar. Este proceso se realizó también durante los dos días siguientes, de modo que se realizó a las 24, 48 y 72 h post-transfección.

Tras la última infección, y en el caso de la sobreexpresión con pBabe, las células Phoenix se observaron en el microscopio de fluorescencia y se comprobó el porcentaje de células transfectadas mediante la expresión de GFP, lo cual indica la cantidad de virus producido y del rendimiento de la infección.

#### **3.5.8. Selección celular**

Para terminar, antes de realizar los experimentos deseados, se necesitó seleccionar específicamente aquellas células modificadas. Si el gen selector del plásmido era el antibiótico Puromicina, se dejaron creciendo las células durante un cierto tiempo, a una concentración de Puromicina de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , de modo que ninguna de las células que no hubiese sido infectada pudiera sobrevivir. Después de diversos pases celulares y durante aproximadamente 7-14 días, pudimos determinar que se disponía de una línea celular estable y modificada.

### 3. Material y Métodos

---

Para comprobar que no sólo se observaba una buena infección, si no que el plásmido se encontraba haciendo el efecto deseado, se extrajo ARN y proteína para observar el aumento o la disminución del gen modificado.

#### 3.6. Ensayos funcionales

Los estudios funcionales a realizar se basaron en el estudio de la migración celular mediante el experimento de cierre de surco o *Wound Healing*, y experimentos de proliferación, y ciclo celular.

##### 3.6.1. *Wound Healing*

Para realizar ensayos de migración celular se efectuó un ensayo de cierre de surco o *Wound Healing*. Una vez alcanzado un 95 % de confluencia, se procedió a realizar la apertura de surco mediante una punta de 100  $\mu$ L estándar en los seis pocillos, cambiando de punta entre las diferentes líneas modificadas. Inmediatamente se sacaron imágenes mediante la cámara Axiocam ERc 5s de las regiones donde se había realizado la apertura, y se marcó exactamente la región donde tomamos la fotografía; para tomar la fotografía en la siguiente medida en la misma región. A continuación, se incubaron las células durante doce horas con las condiciones estándar de cultivo celular.

Pasadas doce horas se volvieron a tomar imágenes en aquellas regiones señaladas de donde previamente se habían tomado. Finalmente, mediante el software de análisis de imagen ImageJ, y con la extensión *MRI Wound Healing Tool* se analizó la diferencia del cierre de surco entre las diferentes líneas.

### 3.6.2. Viabilidad/Proliferación celular

Con el objetivo de mediar la viabilidad/proliferación de células tratadas, como para medir la proliferación de las líneas celulares en el tiempo, se sembró un número de células que se creyó conveniente según las características de la línea celular; siendo normalmente  $1 \times 10^4$ , y a diferentes tiempos, según el requerimiento del experimento. Posteriormente, si el experimento lo requería, cada uno de los pocillos en el que están sembradas las células era tratado a diferentes concentraciones. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, o el tiempo de crecimiento para observar la proliferación celular, se midieron los valores de proliferación/viabilidad mediante el kit comercial de Promega llamado CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. A los 100  $\mu\text{L}$  en cultivo se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de este reactivo, y se incubó durante 1-4 horas en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la placa mediante un espectrofotómetro a una  $\lambda=490$  nm. Estos valores se normalizan respecto un blanco, obteniendo finalmente valores de absorbancia proporcionales e indicativos de la viabilidad y proliferación celular.

### 3.6.3. Estudio del ciclo celular

Para poder observar el ciclo celular en las diferentes líneas celulares, utilizamos DAPI (#9542, Sigma Aldrich), el cual se une al ADN, y nos permite cuantificar el material genético.

Se sembraron las líneas celulares modificadas de cáncer de mama en una placa de 12 pocillos, sembrando diferentes réplicas de cada una de las líneas celulares. Previamente al estudio del ciclo celular se recogieron las fracciones de células presentes en suspensión. Recogidas todas las réplicas, se resuspendieron en etanol frío, para permeabilizar las muestras y permitir que entrara el DAPI al interior. Posteriormente se realizó un lavado mediante PBS, se resuspendió en un volumen de 200  $\mu\text{L}$  cada una de las muestras, y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Finalmente, se incubaron durante 30

### 3. Material y Métodos

---

minutos, y se procedió a su lectura mediante los instrumentos de citometría requeridos (BD FACSVVERSE, BD Bioscience).

#### 3.6.4. Apoptosis celular

El estudio del nivel de apoptosis nos permite medir la efectividad del fármaco y el estadio apoptótico de la célula, es decir, si presenta una viabilidad completa, un estado de apoptosis temprana, apoptosis tardía o si presenta necrosis.

Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos según las condiciones que se quería estudiar, con una confluencia de  $2 \times 10^4$  células por pocillo y en diferentes réplicas. Las células se trataron a diferentes concentraciones de fármaco y para diferentes tiempos. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se despegaron con ayuda de tripsina y fueron trasladadas a los respectivos tubos de centrífuga. Se realizó un lavado con 200  $\mu\text{L}$  de PBS y posteriormente se añadieron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Binding Buffer 1x (#V13246, ThermoFisher), 4  $\mu\text{L}$  de DAPI ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 2.2  $\mu\text{L}$  de Anexina V (#ANXVF-200T). Incubamos en oscuridad la mezcla durante 15 minutos, y finalmente procedimos a analizar los resultados con la ayuda de los instrumentos de citometría requeridos (BD FACSVVERSE, BD Bioscience).

#### 3.7. Estudios de metilación

El estudio de metilación de las líneas celulares y de los pacientes se realizó en el laboratorio del Dr. Sandoval en el Hospital Universitario la Fe de Valencia, mediante pirosecuenciación (Pyromark Q24, Qiagen), utilizando el siguiente protocolo.

En primer lugar, y del mismo modo que se describe en el apartado 3.4.1, realizamos la extracción del ADN genómico a partir de *pellets* de líneas

celulares cultivadas en placas Petri P100, y recogidas posteriormente mediante un rascador de células.

#### 3.7.1. Modificación de ADN genómico por Bisulfito de Sodio

El ADN fue modificado con el kit EZ DNA Methylation (ZYMO Research Co., Orange, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de ADN genómico desnaturalizado fue tratado con bisulfito de sodio a 50 °C durante 16 horas en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron añadidas a las columnas proporcionadas por el kit, con la finalidad de eluir finalmente el ADN en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  mediante el tampón de elución. De este volumen, 1  $\mu\text{L}$  del ADN modificado por bisulfito fue utilizado para las siguientes reacciones de PCR.

#### 3.7.2. PCR específica para metilación

Los cebadores utilizados en el presente estudio se obtuvieron de un trabajo publicado previamente en que se estudiaban las mismas regiones que eran de nuestro interés<sup>163</sup>. Para realizar la PCR específica para metilación se utilizó la polimerasa Qiagen HotStarTaq DNA, con el tampón correspondiente, y suplementado con 0.1 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , y 0.5  $\mu\text{mol/L}$  de cada uno de los cebadores *forward* y *reverse*, así como el ADN genómico procesado previamente. Una vez terminados los ciclos de amplificación de la PCR, los productos de PCR fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 10% y visualizados mediante bromuro de etidio.

#### 3.7.3. Pirosecuenciación

Una vez realizada la reacción de PCR, 5-20  $\mu\text{L}$  del producto de PCR fueron mezclados con 2  $\mu\text{L}$  de partículas de resina cubiertas por streptavidina (GE Healthcare Bio-Sciences AB), 40  $\mu\text{L}$  de tampón de unión (10 mM Tris-

### 3. Material y Métodos

---

HCl, 2 M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 7,6) y agua destilada hasta rellenar 80  $\mu$ L de volumen final. La mezcla fue homogeneizada por movimiento constante de 1400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, fue recogida mediante un sistema de vacío y, para terminar, se añadieron los cebadores de secuenciación hasta una concentración final de 330 nM. Los cebadores hibridaron sobre la secuencia molde, incubando las muestras a 80°C durante 2 minutos, enfriándolas posteriormente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, las reacciones de pirosecuenciación y la cuantificación de la metilación se realizó mediante el sistema PyroMark Q96 versión 2.0.6 (Qiagen), utilizando los reactivos adecuados y los protocolos recomendados.

#### 3.8. Hibridación genómica comparada (aCGH)

En nuestro estudio se utilizaron datos de aCGH (del inglés array Comparative Genomic Hybridization) de 53 líneas celulares realizadas por el Dr. Climent durante su estancia del *post-doc* en grupo del Dr. Alan Balmain en la UCSF.

El *array* de las 53 líneas celulares consta de un estudio de líneas celulares de cáncer de mama de diferentes subtipos (Basal, Mesenquimal, Luminal), con la finalidad de encontrar diferencias en el estado de regiones génicas, o estado de genes entre los diferentes subtipos estudiados. Dicho *array* constaba de 26 líneas celulares basales, 18 líneas celulares luminales y 9 mesenquimales. Dichas líneas celulares fueron elegidas según la disponibilidad de las líneas en el centro.

### 3.9. Bioinformática

Los experimentos y análisis *in silico*, tanto del array aCGH de las líneas celulares, como de los experimentos de correlación de *TRIM29* con diferentes genes en líneas celulares, fueron realizados bajo supervisión del bioinformático del grupo. Se realizó una posterior validación con otra base de datos de líneas de un número de muestras mayores, y mediante muestras biológicas, mediante diferentes metodologías descritas a lo largo de la tesis.

Los experimentos de enriquecimiento funcional fueron realizados mediante la herramienta disponible online EnrichR. Con la ayuda de esta aplicación, y mediante los genes positivamente correlacionados con *TRIM29*, se buscaron rutas y funciones relacionadas, con la finalidad de estudiar posteriormente mediante experimentos funcionales dichas relaciones.

### 3.10. Análisis estadístico

El análisis de resultados se llevó a cabo mediante diferentes programas estadísticos como R UCA (R Project con interfaz usuario) y GraphPad Prism 6, realizando los test estadísticos más convenientes en cada uno de los casos, siendo los más comúnmente utilizados los chi-cuadrado y ANOVA para el estudio del estado de los genes en pacientes y en líneas celulares, y el test-t para comparación de medias de las diferentes réplicas en el resto de estudios como *Wound Healing*, apoptosis o proliferación. Para cada experimento se utilizaron al menos 3 réplicas para cada una de las condiciones, para poder estudiar la comparación de medias y, por lo tanto, obtener una significancia estadística en aquellos casos en los que existiese un p-valor menor de 0,05.



## ***4. Resultados***



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Delimitación de la región genómica

Partiendo de la región delimitada por los ocho BACs descritos en el apartado de la hipótesis, se vio que la delección de dicha región estaba relacionada con la recaída a la enfermedad en aquellos pacientes no tratados con quimioterapia, tal y como se explica en el estudio publicado por Climent, *J et al.*<sup>126</sup>. En este estudio se intentó acotar aquella región que estaba más relacionada con los cambios en la sensibilidad al tratamiento mediante antraciclinas y, de manera más específica, que gen o genes en esta región podría tener alguna función directamente relacionada con la respuesta al tratamiento. En la **Tabla 16** se muestran los BACs presentes en la región delecionada, relacionada con la recaída a la enfermedad, en pacientes no tratados con quimioterapia. Se muestra también el porcentaje de recaída de aquellos pacientes no tratados y que presentan delección de la región que comprenden dichos BACs. Las localizaciones de los BACs en el cromosoma 11 se muestran en la **Figura 12**.

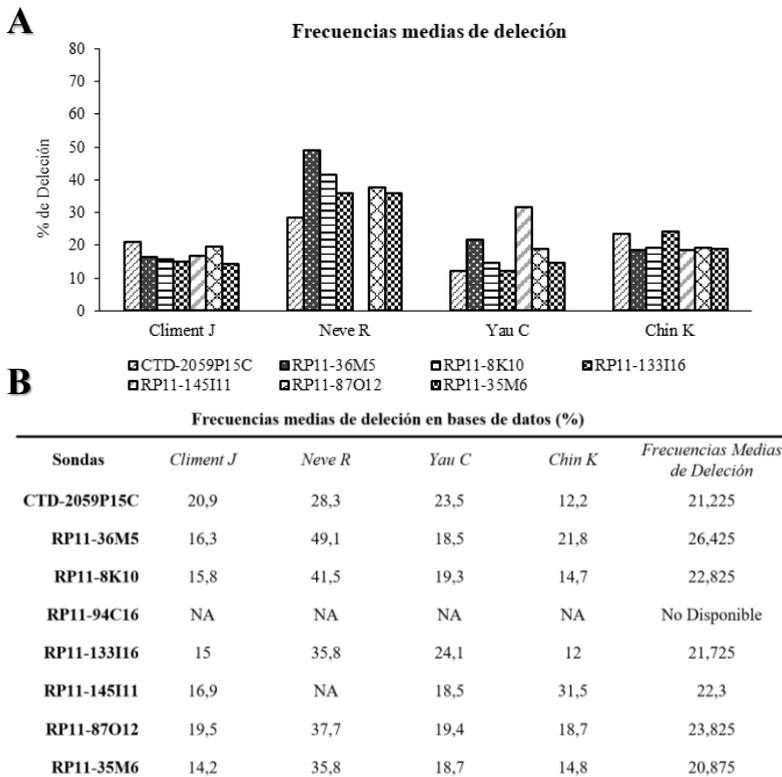
**Tabla 16. Relación de la delección de la región 11q23.3, acotada por ocho BACs, con la recaída en pacientes no tratados con antraciclinas.**

Sonda	Región Cromosómica	p-Valor	No delección en Pacientes NO Tratados con Quimioterapia			Delección en Pacientes NO Tratados con Quimioterapia		
			No Recaída	Recaída	%Recaída	No Recaída	Recaída	%Recaída
CTD-2059P15C	11q23.1	0.003	68	7	9,33	7	9	56,25
RP11-36M5	11q23.2	0.042	66	8	10,81	11	9	45,00
RP11-8K10	11q23.3	0.039	62	8	11,43	11	9	45,00
RP11-94C16	11q23.3	0.039	67	9	11,84	8	8	50,00
RP11-133I16	11q23.3	0.039	60	9	13,04	9	7	43,75
RP11-145I11	11q24.1	0.039	64	7	9,86	7	8	53,33
RP11-87O12	11q24.1	0.039	57	8	12,31	10	8	44,44
RP11-35M6	11q24.1	0.039	69	8	10,39	8	9	52,94



estas regiones, delimitando así una región más pequeña con el fin de identificar los genes candidatos implicados en las diferencias encontradas. Estas bases de datos procedían de diferentes los estudios publicados de Climent, J. *et al.*<sup>126</sup>, Neve, R., *et al.*<sup>167</sup>, Yau, C. *et al.*<sup>168</sup> y Chin, K. *et al.*<sup>169</sup>.

En todas las bases de datos estudiadas, los BACs de las regiones correspondientes con 11q23.1-11q24.1 presentaban un valor por encima del umbral de deleción determinado, por ello, encontramos esta región ampliamente delecionada en gran parte de las muestras. En la **Figura 13** podemos ver una tabla resumen y las frecuencias de deleción en las diferentes bases de datos.



**Figura 13. A) Representación de las frecuencias de deleción descritas en el apartado B. B) Frecuencias de deleción de los BACs en diferentes poblaciones de los estudios de Climent, J. *et al.*<sup>126</sup>, Neve, R., *et al.*<sup>167</sup>, Yau, C. *et al.*<sup>168</sup> y Chin, K. *et al.*<sup>169</sup>.**

#### 4. Resultados

---

Tres de los ocho BACs estudiados presentaban delección en la mayoría de las bases de datos estudiadas, siendo, por lo tanto, las regiones más comúnmente delecionadas en el grupo de pacientes estudiados. Por ello, se creyó interesante observar qué genes estaban presentes en dichas regiones, y que posibles funciones tenían. Entre todos los diferentes genes presentes, destacaba el gen *ATDC* (Ataxia Telangiectasa Grupo D, o también conocido como *TRIM29*), presente en la región 11q23.3, correspondiente a la región delimitada por el BAC RP11-8K10. Son múltiples las evidencias que nos han llevado a elegir *TRIM29* como candidato.

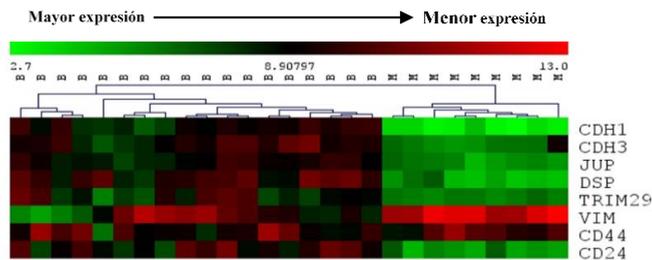
En primer lugar, tal como hemos explicado en el apartado 1.5.2, *TRIM29* está relacionado con la radiosensibilidad, y por lo tanto puede presentar alguna función en la protección del daño al ADN frente a agentes ionizantes. Además, como también se ha explicado en el mismo punto, quedando representado en la **Figura 6** y **Figura 7**, *TRIM29* ha sido utilizado por Sorlie, T. para subclasificar los diferentes subtipos de cáncer de mama<sup>54,55</sup>.

Por lo tanto, creímos que sería de interés el estudio de la región 11q23.3, que engloba a *TRIM29*, con la finalidad de observar el estado de la misma al completo en los diferentes subtipos de cáncer de mama. Estos subtipos quedan representados dentro de los diferentes subtipos de cáncer de mama de diversas líneas celulares utilizadas. Se estudiarán las posibles implicaciones biológicas que presenta *TRIM29* en cuanto a la radiosensibilidad, en procesos de proliferación y migración.

## 4.2. Estudios de *Copy Number Variation* en líneas celulares

### 4.2.1. Subclasificación de las líneas celulares de cáncer de mama

En nuestro estudio separamos las líneas celulares en 3 subtipos diferentes, llamados Luminal, Basal y Mesenquimal. El subtipo Luminal agrupaba tanto a los subtipos Luminal A, como Luminal B, con características de ambos subtipos. Por otra parte, el subtipo Basal-like se separaba en dos subtipos diferentes, llamados Basal y Mesenquimal. El subtipo Basal se diferenciaba del Mesenquimal en ciertos marcadores encontrados que se expresaban de manera diferencial en un subtipo con respecto al otro. Estos marcadores constaban de moléculas de adhesión intercelular como Cadherinas (*CDH3* (P-Cadherina) y *CDH1* (E-Cadherina)), así como queratinas. Entre estos genes también se encontraba la *VIM* (Vimentina) y *TRIM29*, entre otros, como *CD44* y *CD24* implicados en el contacto célula-célula y en la diferenciación celular, respectivamente (**Figura 14**).



**Figura 14.** Resultado de un array de expresión mediante el cual se facilitó subclasificar las líneas celulares en basales y mesenquimales según los niveles de expresión de genes relevantes como *TRIM29*, *VIM*, Cadherinas y los marcadores *CD44* y *CD24*.

Además de las diferencias en la expresión de los genes anteriormente mencionados, las células basales presentaban características morfológicas diferentes a las mesenquimales. Las líneas celulares basales presentaban una remarcada interacción estromal, así como con la matriz extracelular. En cambio, las células de tipo Mesenquimal presentaban una pérdida de polaridad celular, una pérdida de interacción celular y una mayor capacidad invasiva. El subtipo Mesenquimal descrito presentaba gran parte de las características

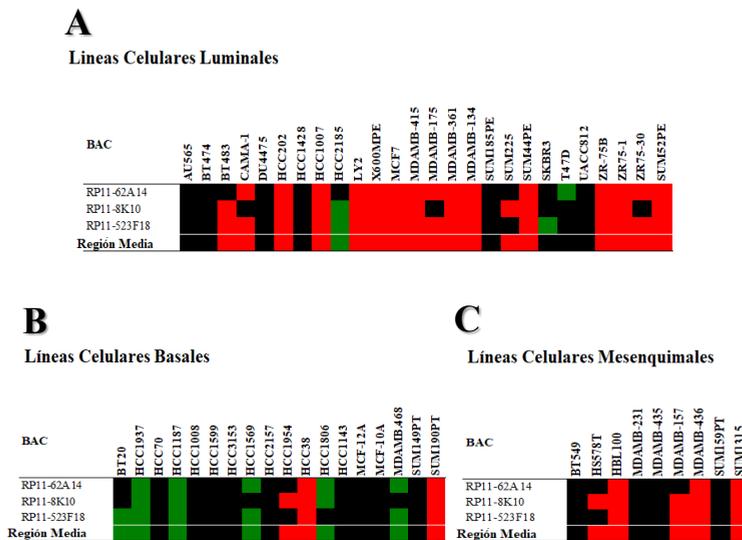
## 4. Resultados

correspondientes con el subtipo descrito por el grupo de Perou como Claudin-low<sup>20</sup> basándose en su perfil molecular.

### 4.2.2. aCGH de la región 11q23.3 en líneas celulares

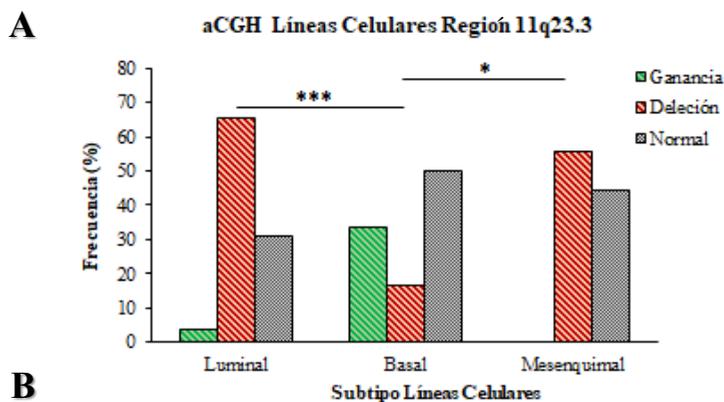
A partir de los datos genómicos previos procedentes del análisis de aCGH de 53 líneas celulares<sup>167</sup> se analizó la región 11q23.3, separando las mismas en los diferentes subtipos moleculares. Para determinar las alteraciones presentes en la región donde se localiza el gen no solo vamos a utilizar el BAC RP11-8K10, sino que vamos a tener también en cuenta los BACs de la región previa y la posterior (RP11-62A14 y RP11-523F18 respectivamente), para determinar las posibles alteraciones en la región completa.

En la **Figura 15** se muestran las alteraciones de aCGH de las diferentes sondas, en los diferentes subtipos de líneas celulares.



**Figura 15.** Array aCGH de 53 líneas celulares, separadas según los subtipos A) Luminal, B) Basal y C) Mesenquimal, donde se muestra tanto el BAC en el cual está presente el gen TRIM29 (RP11-8K10), como los BACs correspondientes a la región anterior y posterior de donde se encuentra el gen que queremos estudiar. A partir de las 3 regiones determinamos las alteraciones de la región total.

Resumen de las alteraciones encontradas en la región 11q23.3 en los diferentes subtipos:



Frecuencias (%)	Estado de la Región 11q23.3		
Subtipo Líneas Celulares	Ganancia	Delección	Normal
Luminal	3,8	65,4	30,8
Basal	33,3	16,7	50
Mesenquimal	0	55,6	44,4

Figura 16. A) Representación de los resultados expuestos en el apartado B, donde se observan los porcentajes de las alteraciones de la región 11q23.3 según el *array* aCGH de las 53 líneas celulares. B) Frecuencias de las diferentes alteraciones de la región 11q23.3 de los resultados previamente descritos en la Figura 6, separadas según los subtipos de las líneas celulares.

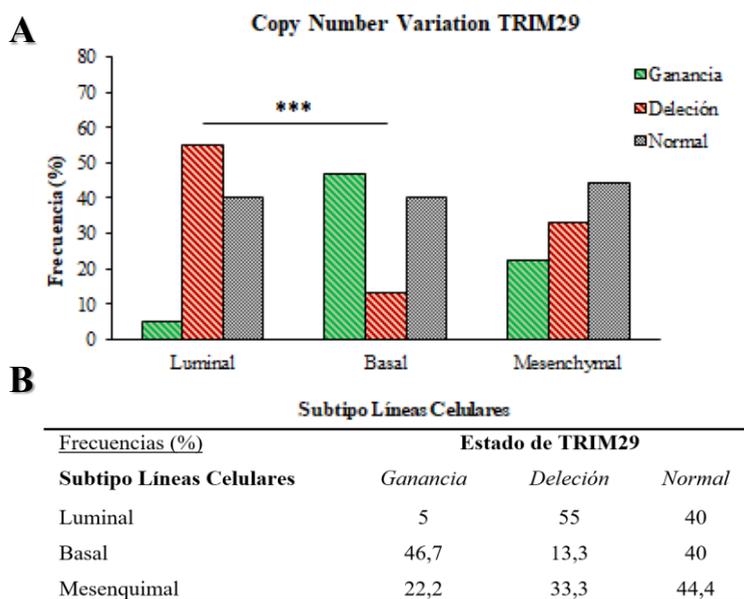
Como podemos observar en la **Figura 16**, existen diferencias significativas entre los diferentes subtipos de cáncer de mama. En el subtipo Basal existe un valor de ganancia de la región en un 33.3%, al contrario que el subtipo Luminal (4%) y Mesenquimal donde no se observa (0%). Por el contrario, la delección de esta región es más frecuente en los subtipos Luminal y Mesenquimal, con un 64% y 55.6% respectivamente, frente al 21.1% en el subtipo Basal.

Tras analizar los subtipos por separado, observamos diferencias entre el subtipo Luminal y Basal ( $p$ -valor=0,002045), entre el subtipo Basal y Mesenquimal ( $p$ -valor=0,04734), y no observamos diferencias entre el subtipo Luminal y Mesenquimal ( $p$ -valor=0,6658).

## 4. Resultados

### 4.2.3. Copy Number Variation de TRIM29 en líneas celulares

Con el fin de estudiar de manera más específica la región exacta de *TRIM29*, analizamos el número de copias del gen mediante PCR cuantitativa. Basándonos en los cálculos previamente descritos por D'haene B. *et al*<sup>170</sup>, determinamos que existía una ganancia del número de copias cuando el valor relativo obtenido frente a *RNaseP* era superior a 2,449, y una delección cuando el valor no superaba el umbral de 1,414, por ello, de acuerdo con este criterio valoramos el estado de la región del gen *TRIM29* como Ganado, Delecionado o simplemente sin cambios o Normal. Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 17**.



**Figura 17.** A) Representación de los resultados expuestos en el apartado B, donde se observan los porcentajes del estado de la región 11q23.3. B) *Copy Number Variation* del gen *TRIM29* determinado en los diferentes subtipos de las líneas celulares.

Los resultados obtenidos mediante el estudio del gen *TRIM29* según su número de copias estudiadas mediante técnicas de PCR cuantitativa, mostrados en la **Figura 17**, son semejantes a aquellos observados en el *array* CGH previamente estudiado. En este caso, el subtipo de líneas celulares donde se observa mayor ganancia del gen corresponde con el subtipo Basal, seguido del subtipo Mesenquimal y finalmente del Luminal, con valores de 46.7%, 22.2% y 5% respectivamente. Por otro lado, los valores de delección vuelven a ser más elevados en el subtipo Luminal, seguido del Mesenquimal, finalizando con el Basal, observándose valores de 55%, 33.3% y 13.3% respectivamente. Tras analizar los resultados, observamos que las diferencias observadas eran semejantes a aquellas obtenidas en los experimentos de aCGH. Existen diferencias significativas entre el subtipo Luminal y Basal (p-valor=0,005204), y no se observan diferencias entre los subtipos Luminal y Mesenquimal (p-valor=0,2993), y entre Basal y Mesenquimal (p-valor=0,3673).

#### 4.2.4. FISH de *TRIM29* en líneas celulares

Con el fin de validar los resultados sobre el estudio de la región 11q.23.3, y de manera más específica *TRIM29*, obtenidos previamente, realizamos el FISH del gen de interés. Esta técnica es más exacta, ya que nos permite contabilizar el número de copias exacto que presenta el gen en cada una de las células. El BAC CTD-3034O11 fue el utilizado para observar el número de copias de *TRIM29*. En la **Figura 18** se muestran los resultados del FISH de algunas de las líneas validadas mediante esta técnica.

#### 4. Resultados

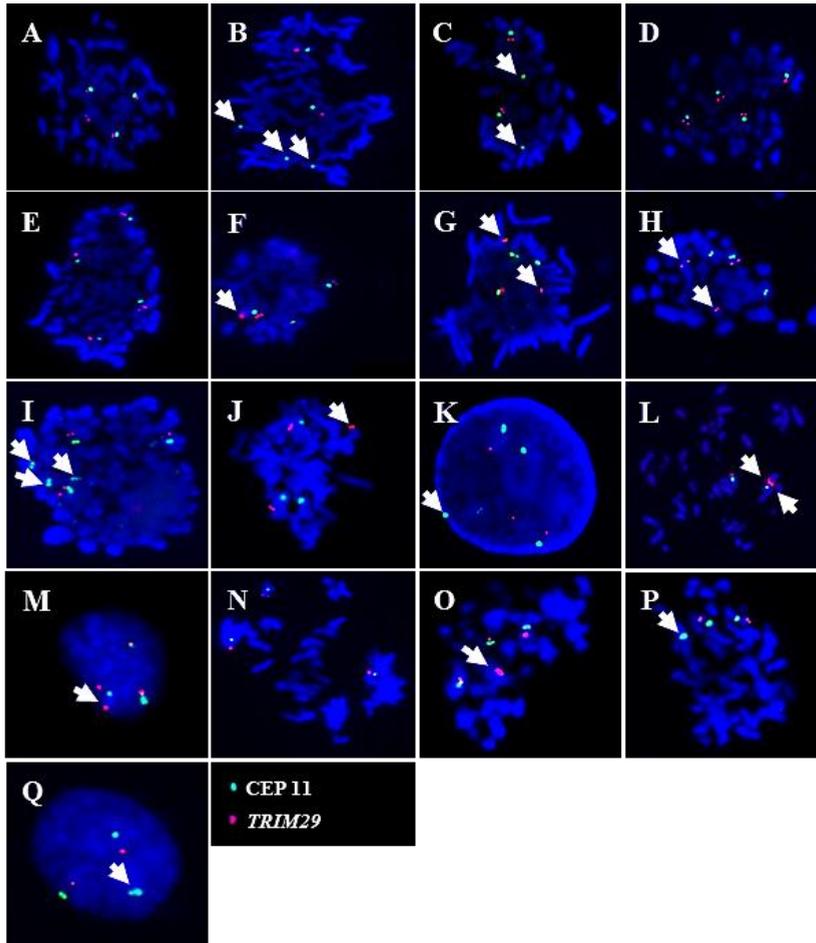


Figura 18. Fluorescencia *in situ* de una representación de líneas celulares luminales como A) HCC2185, B) Ly2, C) MCF7, D) T47D, E) AU565 y F) ZR75-1; basales como G) HCC1937, H) HCC3153, I) HCC1954, J) HCC1806, K) HCC38, L) BT-20 y M) HCC1569; y mesenquimales como N) BT-549, O) MDA-MB231, P) MDA-MB436 y Q) HBL-100. La señal verde de las imágenes corresponde con la sonda centromérica comercial del cromosoma 11, y la señal roja corresponde con la sonda construida a partir del BAC CTD-3034O11 del gen TRIM29.

Los resultados obtenidos en el FISH, mostrados en la **Tabla 18**, siguen la misma tendencia que los resultados previamente obtenidos para TRIM29 en el array aCGH y los experimentos de *Copy Number Variation*. En primer lugar, observamos como de entre todas las líneas luminales estudiadas, Ly2 y T47D presentan una delección del gen (**Figura 18.B** y **Figura 18.C**), ya que observamos más señales correspondientes a la sonda centromérica que a

la de nuestro gen. Por otro lado, también observamos una posible translocación en la línea celular ZR75-1 (**Figura 18.F**).

En las líneas celulares basales observamos una ganancia de nuestro gen en varias ocasiones, como en la línea BT20 (**Figura 18.L**). Vemos también como algunas de las líneas presentan una delección, como HCC1954 (**Figura 18.I**) y HCC38 (**Figura 18.K**), y también translocaciones en las líneas HCC1937 (**Figura 18.G**), HCC3153 (**Figura 18.H**) y HCC1806 (**Figura 18.J**), que no afectan a la expresión de nuestro gen de manera negativa, sino que algunas de las células en las que hipotéticamente se presenta *TRIM29* translocado, tienen una expresión más elevada tal y como se verá más adelante (**Figura 19**). Éste es el único subtipo molecular que presenta ganancia en el número de copias de *TRIM29* de manera significativa cuando se compara con los otros subtipos.

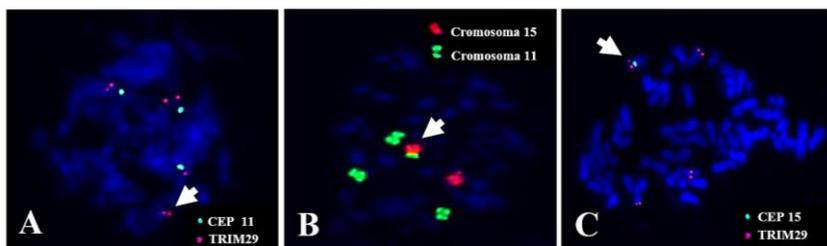
Por último, en las líneas celulares mesenquimales observamos delección de *TRIM29*, tal y como se observa en la línea celular MDA-MB436 (**Figura 18.P**) y HBL-100 (**Figura 18.Q**). Además, observamos una posible translocación en la línea celular MDA-MB231 que según parece podría estar afectando al gen ya que la sonda se divide en dos (**Figura 18. O**).

**Tabla 18. Contaje de las alteraciones de las líneas celulares validadas por FISH sobre el número de copias de TRIM29.**

Frecuencias Alteraciones <i>TRIM29</i>					
Subtipo Celular	Línea Celular	% Ganancia	% Delección	% Normal	Alteraciones Cromosómicas <i>TRIM29</i>
<b>Luminal</b>	AU565	9,71	9,71	<b>80,58</b>	-
	HCC 2185	24	13	<b>63</b>	-
	Ly2	0	<b>100</b>	0	-
	MCF7	0	<b>99,06</b>	0,94	-
	T47D	11,4	0	<b>88,6</b>	-
	ZR75-1	3,6	35,14	<b>61,26</b>	Translocación
<b>Basal</b>	BT-20	<b>86,11</b>	1,85	12,04	-
	HCC 1937	23,6	29,2	<b>47,2</b>	Translocación
	HCC 3153	39	5,7	<b>55,3</b>	Translocación
	HCC 1569	<b>83,16</b>	0	16,84	-
	HCC 1954	0	<b>98,12</b>	1,88	-
	HCC 38	19,7	39,3	<b>41</b>	-
	HCC 1806	8,8	2	<b>89,2</b>	Translocación
<b>Mesenquimal</b>	BT-549	28,7	6,5	<b>64,8</b>	-
	HBL100	3,77	<b>85,18</b>	11,11	-
	MDAMB-231	0	0	<b>100</b>	Translocación
	MDAMB-436	1,8	<b>76,4</b>	21,8	-

### 4.2.4.1. Translocación de *TRIM29* en MDAMB-231

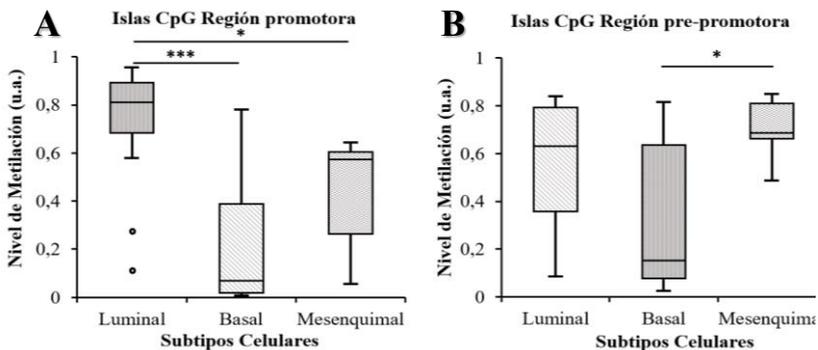
Una de las copias del gen *TRIM29* en la línea celular MDAMB-231 parecía estar dividida y localizada en otro cromosoma distinto al 11 (**Figura 19.A**). En un estudio de 2001 se vio que la línea celular MDA-MB231 presenta una disrupción del cromosoma 11q23 a nivel del gen *ATM*<sup>171</sup>. El grupo de Sheriff *et al.*<sup>172</sup> observó además que existía la posibilidad de que se presentara una translocación recíproca t(11;15)(q23;q15) en líneas con *TP53* +/+ mutado. Debido a todos los antecedentes descritos, y mediante la técnica del pintado de los cromosomas 11 y 15, en la cual múltiples sondas de un mismo color fluorescente hibridaban en regiones complementarias de los cromosomas correspondientes, comprobamos que en la línea MDA-MB231 presentaba una translocación desde el cromosoma 11q al cromosoma 15q (**Figura 19.B**). Finalmente, para comprobar si la translocación se producía a nivel del gen *TRIM29* y por lo tanto si realmente había una fractura del gen realizamos un FISH de *TRIM29* con el centrómero del 15, y observamos que, tal y como sospechábamos, nuestro gen estaba partido y presente tanto en el cromosoma 11q23, como en el cromosoma 15q, no observándose dos verdaderas copias, sino un gen partido en dos (**Figura 19.C**). Esta sospecha viene confirmada debido a que en todas las células vistas por FISH se aprecia claramente la diferencia de intensidad, de la señal fluorescente de la sonda fragmentada presente junto con el CEP11.



**Figura 19.** A) FISH de la línea celular MDAMB-231 de *TRIM29* (en rojo) y del CEP11 (en verde). B) Pintado cromosómico en la línea celular MDAMB-231 de los cromosomas 11 (en rojo) y 15 (en verde) observándose la translocación de una región del cromosoma 11 al cromosoma 15. C) FISH en la línea celular MDAMB-231 utilizando la sonda de *TRIM29* (en rojo) y el CEP15 (en verde), confirmando que la translocación del gen al cromosoma 15 se realiza a la altura de *TRIM29* fragmentándolo.

### 4.3. Metilación de *TRIM29* en líneas celulares

Con el fin de comprobar si la expresión de *TRIM29* no solo está condicionada por el número de copias y/o mutaciones o cambios en la región 11q23.3, estudiamos las variaciones en aspectos epigenéticos como la metilación de la región promotora del gen. Esta metilación ocurre en regiones ricas en nucleótidos CG, llamadas islas CpG, presentes regiones reguladoras, donde la citosina es metilada formando 5-metilcitosina, y por lo tanto impidiendo en cierta medida la transcripción del gen. Los niveles de metilación están inversamente relacionados con los niveles de transcripción del gen. En nuestro caso hemos estudiado la metilación de las islas CpG presentes en el promotor de *TRIM29*, y de la orilla de las islas CpG, presentes en las regiones cercanas a la región promotora, llamada en nuestro trabajo pre-promotora. Para ello se diseñaron unos oligonucleótidos específicos en la región promotora de *TRIM29*, extraídos a partir de estudios previamente publicados<sup>163</sup>, con la finalidad de determinar mediante pirosecuenciación el estado de metilación. Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 20**.



**Figura 20.** A) Representación de los niveles de metilación en la región de las islas CpG de la región promotora de *TRIM29*, en las líneas celulares luminales, basales y mesenquimales. B) Representación de los niveles de metilación en la región de las islas CpG de la región pre-promotora de *TRIM29* en las líneas celulares luminales, basales y mesenquimales.

Al igual que en los anteriores experimentos, agrupamos las líneas celulares en los tres subtipos definidos como Luminal, Basal y Mesenquimal.

## 4. Resultados

---

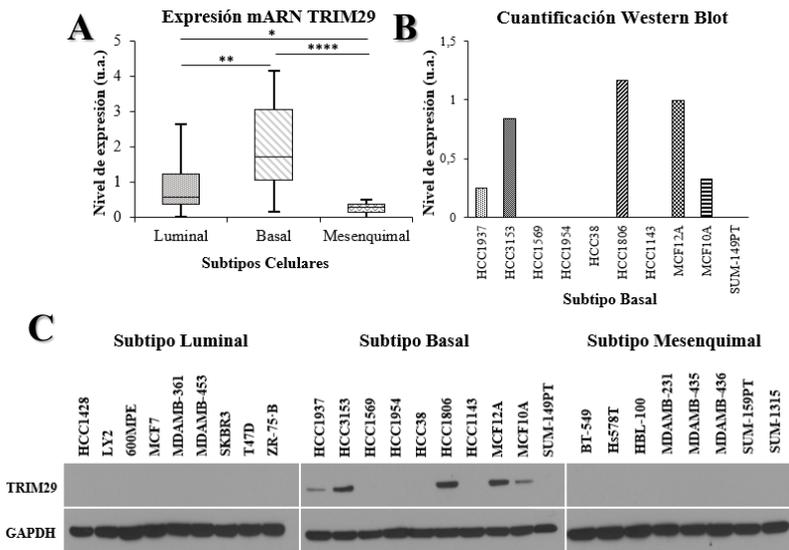
Observamos diferencias significativas entre los diferentes subtipos en cuanto al nivel de metilación, tanto en las islas CpG de la región promotora, como en la región pre-promotora del gen *TRIM29*. Por un lado, en el estudio en la región promotora hemos obtenido diferencias significativas entre el subtipo Basal y Luminal, observando un mayor nivel de metilación en el promotor de *TRIM29* de las líneas del subtipo Luminal, con un p-valor<0,001, y entre el subtipo Luminal y Mesenquimal, observando valores más elevados de metilación en las líneas luminales, con un p-valor<0,05, no encontrando diferencias significativas entre el subtipo Basal y Mesenquimal, observándose una baja y media metilación, respectivamente (**Figura 20.A**). Por otro lado, en el estudio en la región de pre-promotora de *TRIM29*, no hemos encontrado diferencias significativas entre el subtipo Basal y Luminal, pero se observan unos niveles más elevados de metilación en el grupo de líneas celulares luminales. Entre el subtipo Basal y Mesenquimal, se observan unos valores más elevados de metilación en las líneas celulares mesenquimales, obteniendo diferencias estadísticamente significativas, con un p-valor<0,05, no encontrando finalmente diferencias significativas entre el subtipo Luminal y Mesenquimal, observándose una alta metilación en ambos grupos (**Figura 20.B**).

### 4.4. Expresión y Western Blot de *TRIM29* en líneas Celulares

La expresión diferencial de *TRIM29* entre las líneas celulares puede venir determinada por posibles mutaciones presentes en el gen, diferencias en el número de copias y en la metilación de las regiones promotoras de *TRIM29*. Los niveles de expresión de las líneas celulares según el subtipo celular se representan en la **Figura 21**.

La expresión de *TRIM29* en las líneas celulares basales es alta, comparando con las células luminales o mesenquimales, donde se observan bajos niveles de expresión. Podemos observar que existen diferencias

estadísticamente significativas entre el subtipo Basal y Luminal, con un p-valor<0,01, presentando una mayor expresión de *TRIM29* el subtipo Basal, con respecto al Luminal, al igual que entre Basal y Mesenquimal, con un p-valor<0,0001. Entre el subtipo Luminal y Mesenquimal se observó que existía una ligera expresión diferencial de *TRIM29*, siendo ligeramente más alta en luminales, mostrando diferencias significativas con un p-valor<0,05.



**Figura 21.** A) Nivel de expresión del gen *TRIM29* en las líneas celulares luminales, basales y mesenquimales. B) Cuantificación del estudio del nivel de expresión a nivel de proteína de *TRIM29* mediante C) Western Blot en un grupo representativo de líneas celulares luminales, basales y mesenquimales. Observamos que, mediante el estudio del mensajero, los niveles de expresión más altos corresponden con el subtipo Basal. Mediante Western Blot observamos que únicamente las células del subtipo basal son las que presentan expresión de *TRIM29*.

Por otro lado, mediante Western Blot, se observa que un 50% de las líneas del subtipo Basal estudiadas presentan expresión de *TRIM29*, incluyendo las líneas MCF10a y MCF12a. Por otro lado, las líneas celulares estudiadas pertenecientes al subtipo Luminal no presentan expresión en ninguna de ellas, lo que es semejante a aquello visto en los niveles de expresión de cADN. Por último, y al igual que el subtipo Luminal, no vemos expresión

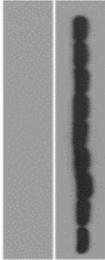
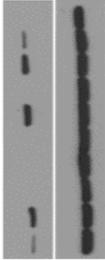
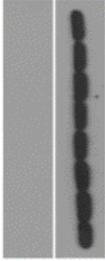
#### 4. Resultados

---

alguna en las células estudiadas del subtipo Mesenquimal, lo que también sigue la misma tendencia que los resultados de expresión a nivel de mRNA observado.

Con todo lo observado y analizado anteriormente, podemos resumir que *TRIM29* no se expresa en el subtipo Luminal y tampoco en el Mesenquimal o Claudin-low, pero si es expresado en aquellas líneas celulares pertenecientes al subtipo Basal. La expresión de *TRIM29* se regula a nivel genómico por ganancias o deleciones de la región genómica correspondiente al gen, por translocaciones de la misma, ocasionando una pérdida de la expresión en luminales y mesenquimales, y mediante diferentes niveles de metilación de las islas CpG presentes en las regiones reguladoras. Un resumen de los factores previamente descritos que influyen en la expresión de *TRIM29* se muestran en la **Tabla 19** y un resumen más detallado de los diferentes experimentos en cada una de las líneas celulares es mostrado en el **Anexo 5**.

Tabla 19. Tabla resumen del estado de *TRIM29* en un grupo de 59 líneas celulares de diferentes subtipos como Luminal, Basal y Mesenquimal, a nivel genómico mediante aCGH y los estudios de *Copy Number* y FISH, a nivel de metilación del ADN y a nivel de expresión, tanto del mRNA, como de la proteína.

	Subtipo Luminal			Subtipo Basal			Subtipo Mesenquimal		
	<i>Deleción</i>	<i>Normal</i>	<i>Ganancia</i>	<i>Deleción</i>	<i>Normal</i>	<i>Ganancia</i>	<i>Deleción</i>	<i>Normal</i>	<i>Ganancia</i>
aCGH	17/26 (65,4%)	8/26 (30,8%)	1/26 (3,8%)	3/18 (16,7%)	6/18 (33,3%)	9/18 (50%)	5/9 (55,6%)	4/9 (44,4%)	0/9 (0%)
Copy Number Variation	11/20 (55%)	8/20 (40%)	1/20 (5%)	2/15 (13,3%)	6/15 (40%)	7/15 (46,7%)	3/9 (33,3%)	4/9 (44,4%)	2/9 (22,2%)
FISH	3/6 (50%)	2/6 (33,33%)	1/6 (16,66%)	2/6 (33,33%)	1/6 (16,66%)	3/6 (50%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)
Metilación (CpG Promotor)	METILADO			HIPOMETILADO			HIPERMETILADO		
Metilación (CpG Pre-promotor)	HIPERMETILADO			HIPOMETILADO			METILADO		
Expresión (mARN)	Baja - 0,586			Alta - 1,73			Baja - 0,29		
Expresión (proteína)									

## 4. Resultados

### 4.5. Caracterización de *TRIM29* en pacientes

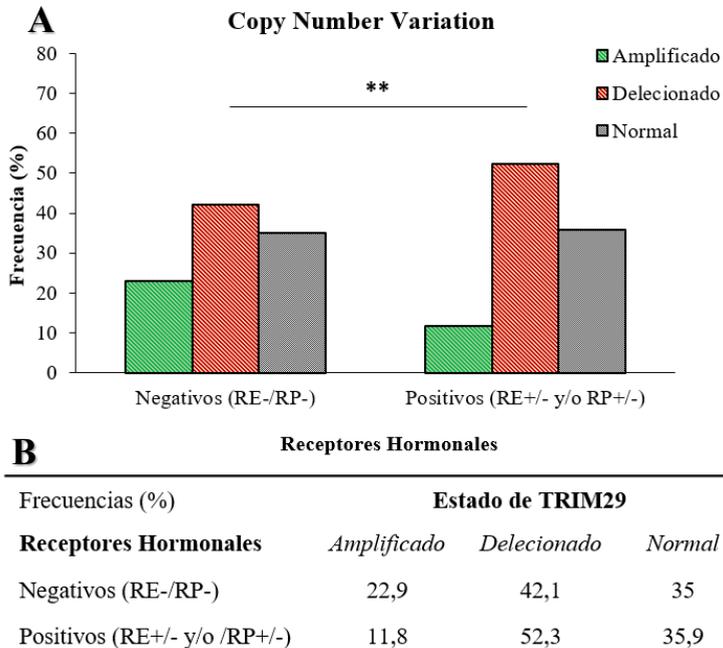
#### 4.5.1. *Copy Number Variation* en Pacientes

La semejanza de los resultados del estado de la región 11q23.3, visto mediante un *array* aCGH, y el estado del gen *TRIM29*, visto mediante experimentos de PCR cuantitativa en las muestras, nos permite reducir costes y simplificar la metodología para obtener resultados de un gran número de pacientes. Por ello, estudiamos aproximadamente 442 pacientes y 68 controles mediante esta técnica con el fin de observar el estado del gen *TRIM29* en todos ellos. Las características clínicas de la población de pacientes obtenidos para el estudio se describen en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.** Características clínicas de una población de 442 pacientes de cáncer de mama.

Características Clínicas		Todos los pacientes, n° y %
Edad	<i>Rango</i>	15-86
	<i>Media</i>	N=442; 53,13
	<i>&lt;=35</i>	42 (9,5%)
	<i>35-55</i>	194 (43,89%)
	<i>&gt;=55</i>	185 (41,89%)
	<i>Sin Datos</i>	21 (4,75%)
Estado Menopausia	<i>Premenopausia</i>	50 (11,31%)
	<i>Perimenopausia</i>	6 (1,36%)
	<i>Postmenopausia</i>	131 (29,64%)
	<i>Sin Datos</i>	255 (57,69%)
Tamaño tumoral	<i>T0</i>	4 (0,9%)
	<i>T1</i>	96 (21,72%)
	<i>T2</i>	172 (38,91%)
	<i>T3</i>	27 (6,11%)
	<i>T4</i>	42 (9,5%)
	<i>TIS</i>	4 (0,9%)
	<i>TX</i>	6 (1,36%)
	<i>Sin Datos</i>	91 (20,59%)
Grado Histológico	<i>I</i>	32 (7,24%)
	<i>II</i>	213 (48,19%)
	<i>IIIA</i>	31 (7,01%)
	<i>IIIB</i>	49 (11,09%)
	<i>IV</i>	25 (5,66%)
	<i>Sin Datos</i>	92 (20,81%)
Receptores Hormonales	<i>ER+</i>	175 (39,59%)
	<i>ER-</i>	259 (58,60%)
	<i>Sin Datos</i>	8 (1,81%)
	<i>PR+</i>	175 (39,59%)
	<i>PR-</i>	259 (58,60%)
	<i>Sin Datos</i>	8 (1,81%)
Receptor HER2	<i>HER2+</i>	33 (7,47%)
	<i>HER2-</i>	178 (40,27%)
	<i>Sin Datos</i>	231 (52,26%)

Así como en las líneas celulares utilizábamos los valores referenciados en el artículo de D'haene B. *et al*<sup>170</sup>, en los pacientes acotamos dicho umbral debido a que en la extracción de ADN no se extrajo únicamente material genético del tumor, sino que también hubo contaminación por tejido normal, lo que podría enmascarar nuestros resultados. Por lo tanto, aquellos pacientes cuyo valor sea inferior a 1,6 se podría determinar que existe una deleción; aquellos valores por encima de 2,25 se determinaría como una ganancia génica y aquellos valores comprendidos entre 1,6 y 2,25 determinaríamos que presentan normalidad. Al igual que en las líneas celulares, estudiamos la posible relación entre el estado del gen *TRIM29* y el estado de los receptores hormonales, tal y como se muestra en la **Figura 22**.



**Figura 22.** A) Representación de los valores de la Tabla del apartado B. B) Estado del gen *TRIM29* en una población de 442 pacientes de cáncer de mama.

Para observar si el estado del gen se asociaba con el estado de los receptores hormonales, agrupamos los pacientes en dos grupos, como

## 4. Resultados

---

Receptores Hormonales Positivos (ER+/- y/o PR+/-) y Receptores Hormonales Negativos (ER- y PR), obteniendo diferencias estadísticamente significativas del estado del gen entre receptores hormonales negativos y positivos, obteniendo un p-valor=0,00633 (**Figura 22.A**).

### 4.5.2. Expresión de TRIM29 en pacientes

Para observar los niveles de expresión proteica de TRIM29 en pacientes, decidimos estudiar mediante inmunohistoquímica dicha expresión en una colección de 97 tumores de cáncer de mama y 23 muestras de tejido sano. A partir de estos tumores se quiso validar la presencia de TRIM29 y la correlación de su expresión con los distintos subtipos de cáncer de mama, o con los niveles proliferativos tumorales. La población anteriormente mencionada es descrita en la **Tabla 21**.

**Tabla 21. Características clínicas de la población de 97 pacientes de cáncer de mama**

<b>Características Clínicas</b>	
<b>Nº pacientes</b>	<b>97</b>
<b>Edad</b>	
<i>Rango</i>	26-89
<i>&lt; 35 años</i>	2(2%)
<i>35-50 años</i>	37 (38%)
<i>&gt;55 años</i>	54 (56%)
<i>Sin Datos</i>	4 (4%)
<b>Estado de menopausia</b>	
<i>Pre-menopausia</i>	21 (22%)
<i>Peri-menopausia</i>	1 (1%)
<i>Post-menopausia</i>	62 (64%)
<i>Sin Datos</i>	13 (13%)
<b>Tipo histológico</b>	
<i>Ductal infiltrante</i>	84(87%)
<i>Lobulillar infiltrante</i>	4 (4%)
<i>Otros</i>	9(9%)
<b>Grado histológico</b>	
<i>Grado I</i>	27 (28%)
<i>Grado II</i>	46(47%)
<i>Grado III</i>	20 (21%)
<i>Sin Datos</i>	4(4%)
<b>Subtipo intrínseco</b>	
<i>Luminal A</i>	66(68%)
<i>Luminal B</i>	10 (10%)
<i>Triple negativo</i>	13 (14%)
<i>Sin Datos</i>	8(8%)

Para realizar dicho estudio se construyeron bloques de parafina con múltiples tejidos tumorales de diferentes pacientes, llamados *Tissue microarray* (TMA). Dicho proceso de elaboración de los TMAs se describe minuciosamente en el apartado 3.2.4.2, correspondiente al Diseño de los bloques de *Tissue microarray* (TMA) en material y métodos. Sobre estos TMAs se realizaron las tinciones de diferentes marcadores para reclasificar los tumores en los distintos subtipos de cáncer de mama. Por ello, se estudió el Receptor de Estrógenos (RE), Receptor de Progesterona (RP), el receptor HER2, el marcador de proliferación tumoral Ki67 y nuestro gen en estudio TRIM29. La cuantificación de los diferentes marcadores se realizó mediante diferentes métodos según los marcadores a estudiar. Los receptores hormonales se cuantificaron mediante la metodología Allred<sup>173</sup>, dando valores desde 0 hasta 8, donde los valores de 0-2 eran traducidos como Negativo, y de 3-8 como Positivo. El marcador Ki67 se cuantificó observando el porcentaje de células positivas presentes en el corte. Finalmente, el gen TRIM29 se cuantificó mediante el método denominado H-Score<sup>174</sup>. Para esta cuantificación se evaluó tanto la intensidad de la tinción citoplasmática, que se puntuó como: 0 (ausencia o muy débil), 1 (débil), 2 (moderada) y 3 (fuerte), como el porcentaje expresado en células. Se calculó el mencionado H-score usando la siguiente fórmula:  $1x (\% \text{ células } 1) + 2x (\% \text{ células } 2) + 3x (\% \text{ células } 3)$ . Se estableció como “*cut off*” el valor de 150 para considerar la muestra como positiva o negativa, ajustado al ruido de fondo observado en la línea celular MDAMB-231 que no expresa TRIM29, estudiada en paralelo.

Los tumores se agruparon según el estado de los receptores hormonales, HER2 y Ki67. En primer lugar, consideramos que los pacientes pertenecían al subtipo Luminal A si presentaban ambos receptores hormonales positivos y HER2 negativo; Luminal B si presentan tanto ambos receptores hormonales positivos como el receptor HER2 positivo; y por último Triple-Negativo si presentaba tanto los receptores hormonales como el receptor HER2 negativo. Un ejemplo representativo de los patrones de tinción analizados y su valoración son representados en la **Figura 23**.

### Marcadores Estudiados

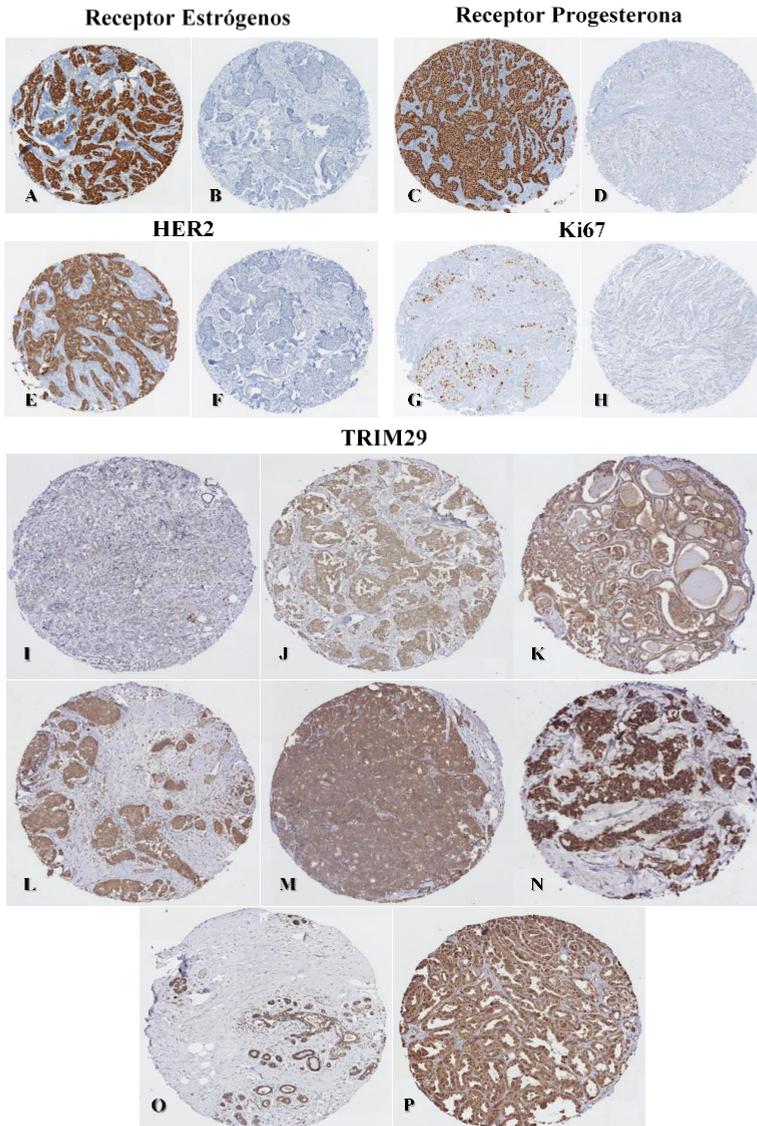


Figura 23. Marcadores estudiados en los TMAs de los tumores de mama. Ejemplos de los distintos marcadores representados según su señal negativa o positiva como los diferentes receptores, o según su H-Score, así como la expresión de TRIM29 en tejido normal. Por una parte, tenemos el A) Receptor de Estrógenos Positivo, B) Receptor de Estrógenos Negativo, C) Receptor de Progesterona Positivo, D) Receptor de Progesterona Negativo, E) Receptor HER2 Positivo, F) Receptor HER2 Negativo, G) Ki67>14 y H) Ki67<14. Por otro lado, tenemos los distintos grados de positividad del gen TRIM29 según el H-Score. I) TRIM29 H-Score<100, J) TRIM29 H-Score 100, K) TRIM29 H-Score 150, L) TRIM29 H-Score 200, M) TRIM29 H-Score 250, N) TRIM29 H-Score 300. Por último, se muestran dos ejemplos de tejido sano con pocos y muchos ductos, en el que aparece la expresión de TRIM29. En O) y P) TRIM29 H-Score 200-300.

En primer lugar, se quiso estudiar la posible relación entre el nivel de expresión de TRIM29 y los diferentes subtipos histológicos de cáncer de mama, reclasificados de nuevo para el presente estudio, obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 24.A**. Podemos observar que los niveles de expresión de TRIM29 eran menores de manera general en todos los subtipos tumorales, comparándolos con el tejido normal. Además, observamos que existían diferencias significativas entre el tejido normal y los tumores clasificados como Luminal A, con un p-valor=0,0011, y Triple negativo, obteniendo un p-valor=0,0015.

Se realizó también la subclasificación de los subtipos tumorales según los niveles proliferativos (alta proliferación (Ki67>14%) o baja proliferación (Ki67<14%)), mostrando los resultados obtenidos en la **Figura 24.B**. Si separamos los grupos en base a su capacidad proliferativa media, mediante los niveles de proliferación de Ki67, observamos que se mantienen las diferencias observadas de la expresión de TRIM29, e incluso se amplían, entre aquellos tumores altamente proliferativos y el tejido normal. Se observa una diferencia entre los tumores Luminal B proliferativos y el tejido normal con un p-valor=0,0025, obteniendo una menor expresión en aquellos tumores Luminal B más proliferativos que en los poco proliferativos. También aparecen diferencias entre los tumores Triple Negativos proliferativos y el tejido normal con un p-valor=0,0067, observando una menor expresión de TRIM29 en aquellos tumores más proliferativos. Las diferencias entre el subtipo Luminal A y el tejido normal se mantuvieron iguales, ya que ningún tumor de este subtipo presentaba un perfil muy proliferativo, con un p-valor=0,0011. Finalmente, aquellos tumores poco proliferativos, tanto del subtipo Luminal B, como del subtipo Triple Negativo, presentaban una expresión de TRIM29 semejante que el tejido normal.

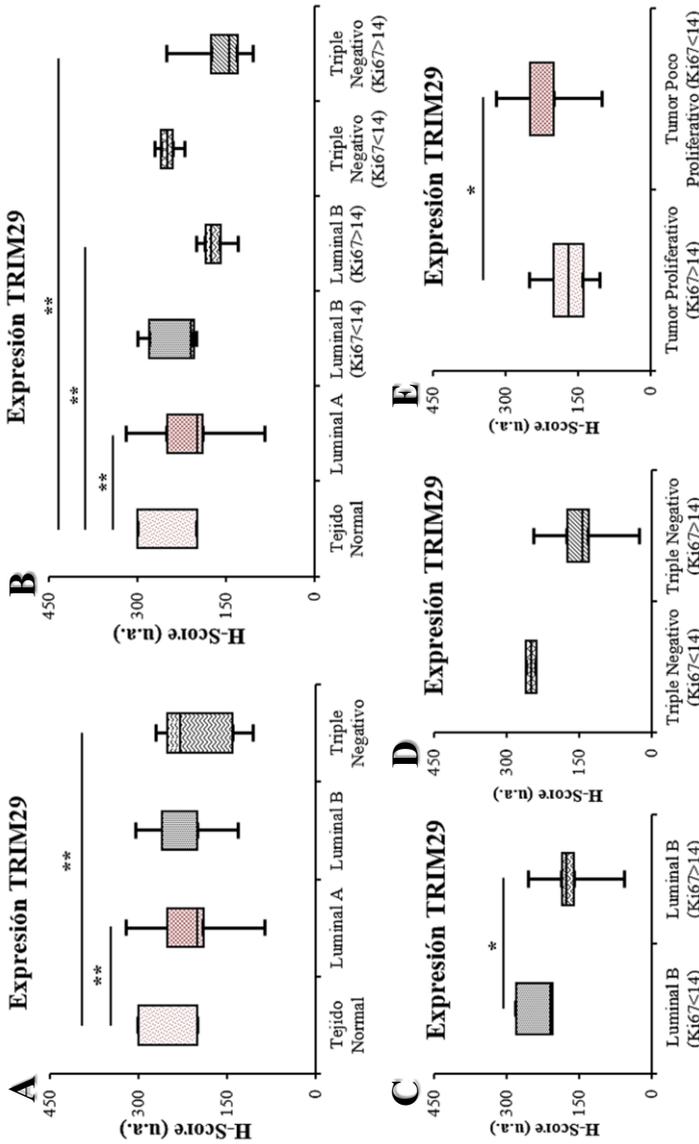
Por otro lado, se estudiaron individualmente los subtipos Luminal B y Triple Negativo, donde existen diferencias de expresión según el nivel proliferativo tumoral entre tumores del mismo subtipo, con la finalidad de

#### 4. Resultados

---

observar si existían diferencias significativas entre ellos (**Figura 24.C** y **Figura 24.D**, respectivamente). Se vieron diferencias significativas en el nivel de expresión de TRIM29 dentro del subtipo Luminal B entre tumores poco proliferativos y altamente proliferativos, con un p-valor=0,0152, observando una menor expresión en aquellos tumores más proliferativos. Además, se observó también una ligera diferencia, obteniendo una tendencia con un p-valor=0,0794, entre tumores del subtipo Triple negativo poco proliferativos y altamente proliferativos en cuanto a la expresión de TRIM29. Hay que destacar que debido a que el número muestral en estos subtipos era bajo, la significancia de los resultados podría haberse visto disminuida.

Para terminar, clasificamos la totalidad de los tumores según su nivel proliferativo (Ki67>14%) y poco proliferativo (Ki67<14%) (**Figura 24.E**), obteniendo diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de TRIM29 entre estos dos grupos, con un p-valor=0,0160, siendo la expresión de TRIM29 más elevada en aquellos tumores que presentaban un nivel de Ki67 más alto y superior al 14%.



**Figura 24.** Nivel de expresión de TRIM29 en tejido Normal y Tumoral. Los tumores han sido clasificados según el subtipo A) Luminal A (RE + y RP + y HER2-), Luminal B (RE +/- y/o RP +/- y/o HER2 +/-) y Triple Negativo (RE -, RP -, HER2 -), y B) dentro de cada subtipo, según el índice de proliferación tumoral (proliferativos (Ki67>14) y poco proliferativos (Ki67<14)). Estudio del nivel de expresión de TRIM29 en C) Subtipo Luminal B y D) Subtipo Triple Negativo. E) Nivel de expresión de TRIM29 en muestras tumorales separando en dos grupos según la capacidad proliferativa que presentan.

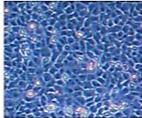
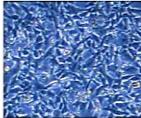
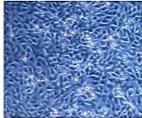
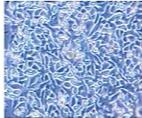
## 4. Resultados

### 4.6. Estudios funcionales en líneas celulares

#### 4.6.1. Selección de las líneas celulares de cáncer de mama

A partir de la colección de 59 líneas celulares, se escogieron aquellas que presentaban una expresión de *TRIM29* adecuada, a partir de las cuales se deseaba realizar los experimentos funcionales. Debido a que las líneas celulares Triple Negativas eran las que presentaban una mayor diferencia en cuanto a la expresión de *TRIM29*, estas fueron escogidas para realizar dichos experimentos. Dos líneas celulares mesenquimales MDAMB-231 y BT-549, que no expresaban *TRIM29*, fueron escogidas con la finalidad de sobreexpresar el gen para observar el efecto del reemplazo del gen en una línea que no lo expresaba. Por otro lado, se escogieron aquellas dos líneas basales que más expresaban *TRIM29*, como HCC1806 y HCC3153, para realizar la disminución de la expresión mediante shRNA, y observar los posibles cambios biológicos que se producían. Las características específicas de cada una de las líneas celulares se resumen en la **Tabla 22**.

**Tabla 22. Características más importantes de las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio.**

Subtipo	Líneas Celulares			
	<i>Mesenquimal</i>		<i>Basal</i>	
Nombre	MDAMB-231	BT-549	HCC1806	HCC3153
Edad	51	72	60	~
Etnia	Caucásica	Caucásica	Africana	~
Grado	Poco Diferenciada	~	II	~
TP53	Mut	Mut	Mut	~
BRCA1	Wt	Wt	Wt	Mutación Homocigota
EGFR	+	+	+	+
Ruta PI3K	Wt	PTEN Delección Homocigota	~	~
Subtipo Basal-like	M	MSL	BL2	BL1
Mutaciones	BRAF, CDKN2A, KRAS, NF2, TP53, PDFGRA	PTEN, RBI, TP53	CDKN2A, TP53, UTX	BRCA1
Morfología				

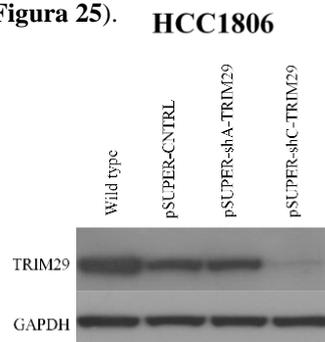
Abr: Mut (Mutado), Wt (*Wild type*). M (*Mesenchymal*), MSL (*Mesenchymal Stem Like*), BL2 (*Basal-like 2*), BL1 (*Basal-like 1*).

#### 4.6.2. Modificación de las líneas por el shRNA-TRIM29 y mediante cDNA-TRIM29.

Las líneas celulares basales HCC1806 y HCC3153, y las mesenquimales MDAMB-231 y BT-549, fueron utilizadas para observar que efecto se observaba al realizar el *Knock-down* de *TRIM29* y que efectos podía tener el restablecimiento de la expresión del gen, tanto a nivel funcional, como en cuanto a la resistencia frente a los tratamientos con Doxorubicina. Por ello, quisimos obtener dos líneas celulares estables que presentaran una disminución de la expresión de *TRIM29* y otras dos, que no presentaran expresión de manera natural, con el gen *TRIM29* sobreexpresado. Para observar la efectividad de la disminución de la expresión y la sobreexpresión estudiamos los niveles de expresión del ARN mensajero y proteína. Los resultados se muestran en las **Figuras 27, 28 y 29**, mostradas en los siguientes apartados.

Como podemos observar, se produjo de manera favorable la sobreexpresión del gen en aquellas líneas que no lo expresaban, y el *knock-down* en aquellas que si lo expresaban. Por una parte, en las líneas mesenquimales modificadas con el cADN de *TRIM29*, observamos que la expresión del gen es considerablemente más alta, tanto a nivel de mensajero, como de proteína, con respecto al control. Por otro lado, se diseñaron diferentes shRNA para *TRIM29*, y se estudió cuál de ellos producía una mayor disminución de la expresión en las líneas celulares basales anteriormente mencionadas. Finalmente se eligió el constructo shC-TRIM29, donde la disminución de la expresión de *TRIM29* fue de entre el 90-95%, y se utilizó este shC-TRIM29 y las líneas modificadas obtenidas con éste shARN para realizar los experimentos posteriores (**Figura 25**).

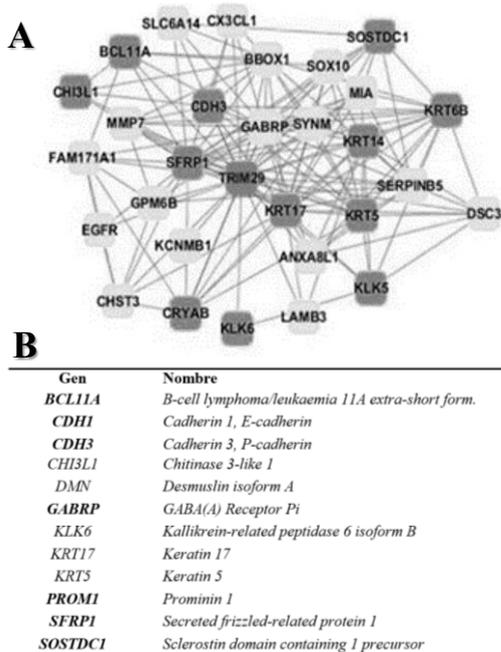
**Figura 25.** Estudio de efectividad de la disminución de la expresión de *TRIM29* mediante dos de los shRNA diseñados para el *knock-down* de *TRIM29*, obteniendo una disminución casi completa en el caso del shC-TRIM29.



## 4. Resultados

### 4.6.3. Estudios de correlación y validación de los genes relacionados con *TRIM29*

Utilizamos una novedosa herramienta basada en metodología computacional, desarrollada en el laboratorio del Dr. Balmain durante la estancia como *post-doc* del Dr. Climent en Estados Unidos, para la generación de redes, basada en múltiples combinaciones de parámetros, con la finalidad de observar la correlación positiva de *TRIM29* con diferentes genes. A partir de 900 muestras de pacientes de cáncer de mama, provenientes de diferentes bases de datos (Desmedt, C.<sup>175</sup>; Chin, K.<sup>169</sup>; Wang, Y.<sup>176</sup>; Sabatier, R.<sup>177</sup>) se consiguieron encontrar genes correlacionados positivamente con nuestro gen, creando una red de genes, donde *TRIM29* está presente en su centro, indicando que es el núcleo de una red de genes (**Figura 26**). Los procesos de dichos genes se encontraban relacionados con procesos como la transición epitelio-mesenquimal, proliferación, adhesión celular, biomarcadores de células triple-negativas y de *cancer stem cells*.



**Figura 26.** A) Genes positivamente correlacionados con *TRIM29*, representando en gris oscuro aquellos que presentaban una mayor correlación. B) Genes más importantes correlacionados positivamente, marcando en negrita aquellos que van a intentar ser validados mediante expresión, Western Blot e Inmunohistoquímica en las líneas celulares mesenquimales y basales modificadas.

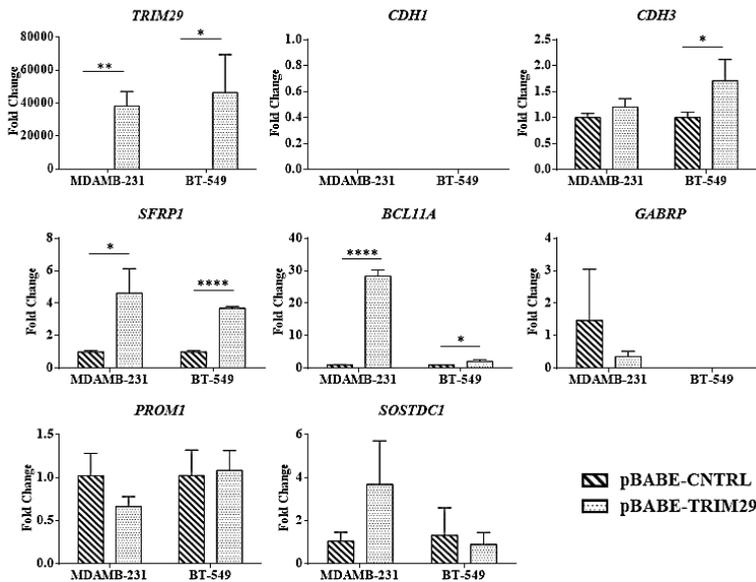
#### 4.6.4. Análisis de los genes correlacionados con *TRIM29* en líneas celulares modificadas

Con el objetivo de confirmar si los genes seleccionados estaban realmente correlacionados con *TRIM29*, validamos su expresión en las líneas previamente modificadas con el gen *TRIM29* sobreexpresado y con *knock-down*. A continuación, se muestran los resultados del estudio de la expresión de los genes a nivel de ARN mensajero (PCR cuantitativa) y proteína (Western Blot e Inmunohistoquímica).

##### 4.6.4.1. Nivel de expresión de los genes correlacionados con *TRIM29*

###### Sobreexpresión de *TRIM29*

En las células mesenquimales BT-549 y MDAMB-231, donde no se expresaba *TRIM29*, se introdujo un plásmido con la finalidad de sobreexpresar el gen, y observar, por lo tanto, los posibles cambios en expresión de genes correlacionados positivamente con *TRIM29*, mostrando finalmente los resultados que se presentan en la **Figura 27**.



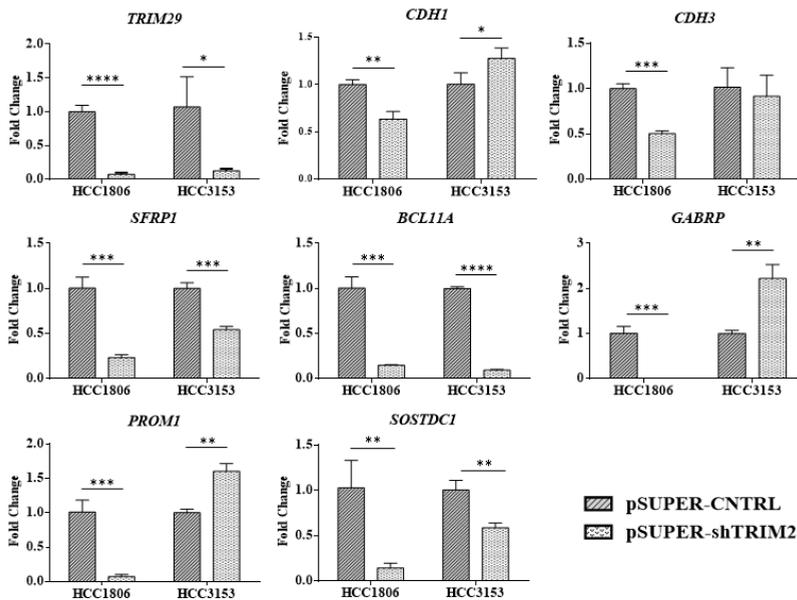
**Figura 27.** Nivel de expresión, determinado mediante PCR cuantitativa, de los genes relacionados positivamente con *TRIM29* en líneas celulares mesenquimales modificadas para que sobreexpresen *TRIM29*, comparándolas con sus respectivos controles que no expresan.

## 4. Resultados

En la **Figura 27** podemos observar que al sobreexpresar *TRIM29* en células donde no lo expresan, ciertos genes previamente relacionados positivamente con *TRIM29*, como *CDH3*, *SFRP1* y *BCL11a* aparecen más expresados en aquellas líneas celulares modificadas comparando con sus respectivos controles, con unas diferencias estadísticamente significativas. El resto de genes no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles.

### Knock-down de TRIM29

En las líneas celulares basales HCC1806 y HCC3153 que presentan una elevada expresión de *TRIM29*, se consiguió reducir su expresión, casi en su totalidad, mediante el sh*TRIM29* mencionado en la **Figura 25**, permitiendo estudiar, por lo tanto, los posibles cambios en la expresión de los genes correlacionados positivamente con *TRIM29*, y obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 28**.



**Figura 28.** PCR cuantitativa de los genes relacionados positivamente con *TRIM29* en líneas celulares basales con los niveles de *TRIM29* reducidos, comparándolas con sus respectivos controles que presentan una sobreexpresión del gen.

En la **Figura 28** observamos que el cambio en la expresión de *TRIM29* produce cambios en la expresión de resto de genes, siendo estos cambios semejantes en ambas líneas celulares en el caso de genes como *CDH3*, *SFRP1*, *BCL11a* y *SOSTDC1*. Por otro lado, observamos cambios opuestos en los genes *CDH1*, *GABRP* y *PROM1* en la línea HCC3153 con respecto a la línea HCC1806.

### 4.6.4.2. Nivel de proteína de los genes correlacionados positivamente con TRIM29

Los resultados anteriores mostrados en las **Figuras 27 y 28** revelan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes positivamente correlacionados con *TRIM29*, entre las líneas celulares modificadas en las que se realizaba una sobreexpresión del gen o una disminución de la expresión, y sus respectivos controles. La expresión de proteína de los genes previamente estudiados se analizó mediante Western Blot, con la finalidad de validar aquellas diferencias previamente observadas, obteniendo los resultados presentes en la **Figura 29**.

Podemos observar que en las líneas celulares mesenquimales, a pesar de observarse cambios en la expresión de genes como *CDH3*, *SFRP1* o *BCL11a* en ambas líneas celulares a nivel de mRNA, no se observa expresión de la proteína o cambio alguno en el patrón de expresión proteico. Únicamente se observan diferencias muy poco marcadas de *BCL11a* y *GABRP* en la línea celular MDAMB-231, y *PROM1* en la línea BT-549.

Por otro lado, en las líneas celulares basales, se observa que la disminución de *TRIM29* conlleva la disminución de algunos genes como *CDH1*, *CDH3*, *BCL11a* y *GABRP* en la línea celular HCC1806, y *CDH3*, *SFRP1* en la línea celular HCC3153. Por el contrario, también conlleva el ligero aumento de la expresión en *GABRP* y *SOSTDC1* en la línea celular HCC3153.

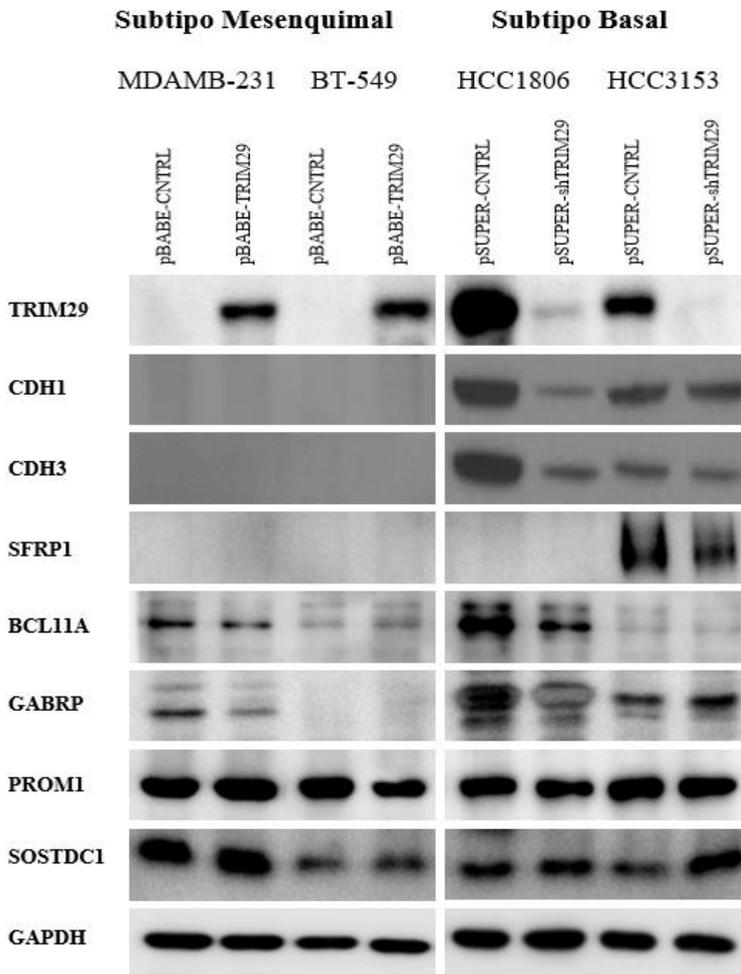


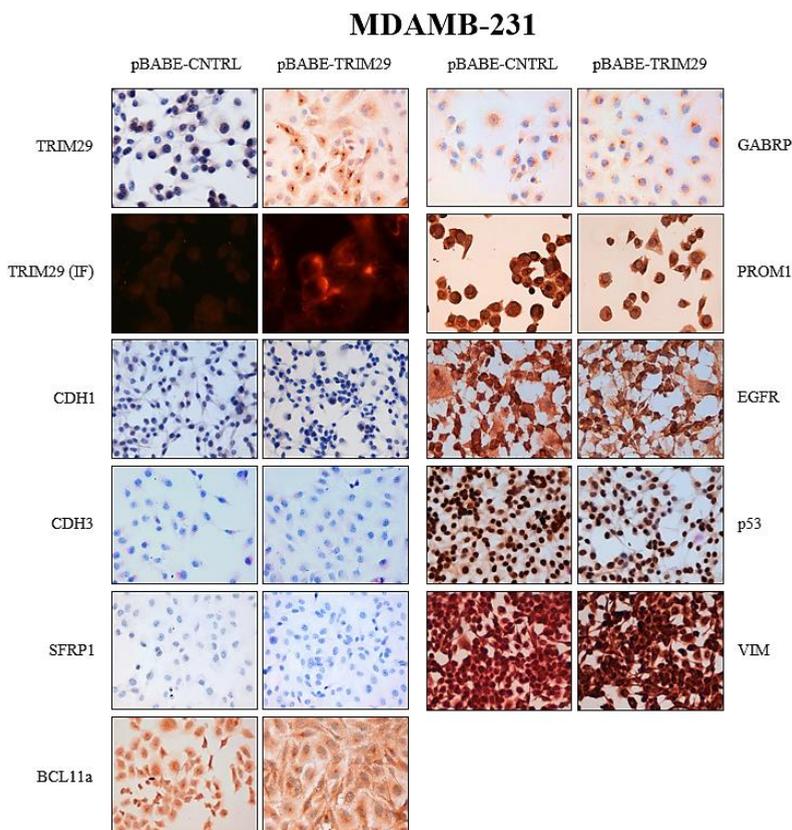
Figura 29. Western Blot de los genes positivamente correlacionados con TRIM29 en las líneas mesenquimales y basales modificadas.

#### 4.6.5. Inmunohistoquímica de los genes correlacionados positivamente con TRIM29

Posteriormente, realizamos la inmunohistoquímica de los genes correlacionados positivamente con TRIM29 en la línea celular mesenquimal MDAMB-231, y en las líneas basales HCC1806 y HCC3153, obteniendo los resultados que se muestran en las **Figuras 30, 31 y 32** respectivamente.

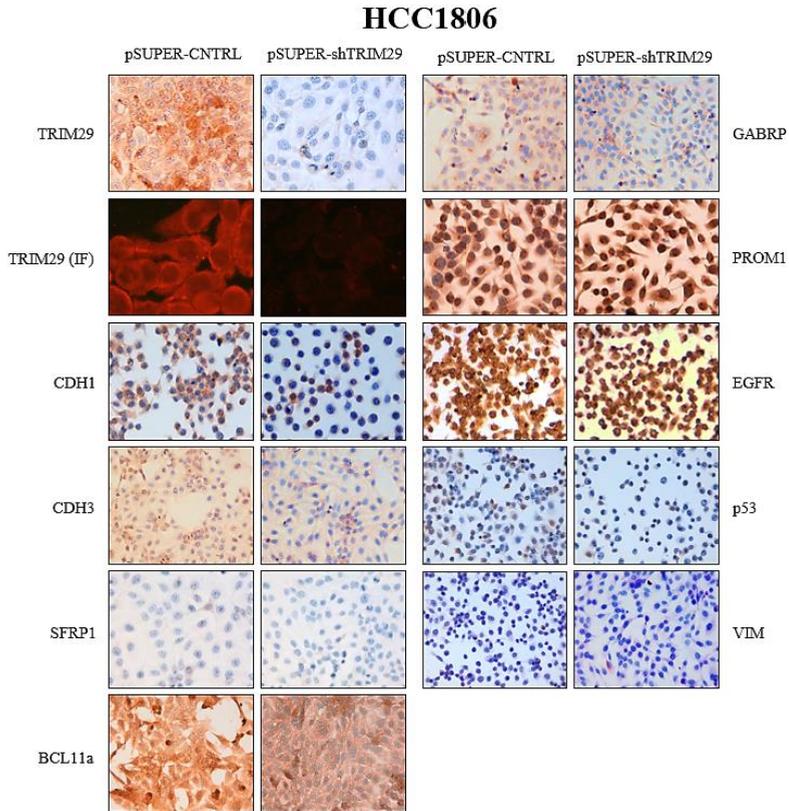
Mediante el estudio de la proteína por inmunohistoquímica, nos fijamos en la sublocalización celular de *TRIM29*, y observamos que en aquellas líneas celulares que lo expresaban de manera natural, éste se expresaba y se distribuía a través de todo el citoplasma y ligeramente en el núcleo. En cambio en la línea celular MDA-MB231, la expresión de *TRIM29* se encontraba focalizada casi en su totalidad en el retículo endoplasmático describiendo lo que es llamado un “patrón Golgi”.

Al igual que mediante inmunohistoquímica, mediante IF observamos mejor como en la línea celular MDA-MB231 pBABE-TRIM29, el gen sobreexpresado se localiza en la región perinuclear, tal y como también observamos mediante inmunohistoquímica. Por otro lado, la expresión de *TRIM29* en las líneas celulares HCC1806 pSUPER-CNTRL y HCC3153 pSUPER-CNTRL, es homogénea y se distribuye a través de todo el citoplasma y ligeramente en el núcleo, tal y como debería presentarse su patrón de tinción normal.



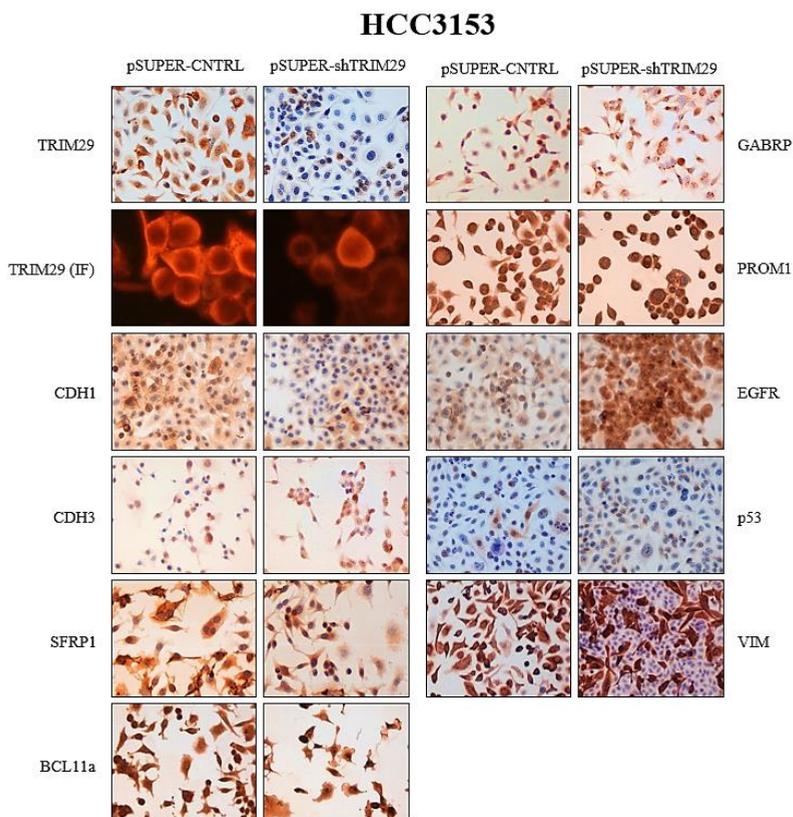
**Figura 30. Inmunohistoquímica de los genes positivamente correlacionados con TRIM29 en la línea Mesenquimal modificada MDAMB-231 y su respectivo control.**

El estudio mediante tinción inmunohistoquímica de las proteínas nos desvela el posible problema con la sobreexpresión de TRIM29, ya que éste, en lugar de presentarse distribuido homogéneamente a través de todo el citoplasma y ligeramente en los núcleos, se encuentra focalizado en la región del retículo endoplasmático alrededor del núcleo, describiendo el anteriormente mencionado patrón Golgi. El resto de proteínas estudiadas en esta línea celular no presentan cambio alguno, salvo el observado en la tinción de TP53, donde observamos una muy ligera disminución de la expresión en la línea celular modificada.



**Figura 31.** Inmunohistoquímica de los genes positivamente correlacionados con TRIM29 en la línea Basal modificada HCC1806 y su respectivo control.

En la línea Basal HCC1806 se observó una disminución total de la proteína de TRIM29 del 90-95%, tanto por inmunohistoquímica como por inmunofluorescencia. Además, entre la línea celular modificada y su respectivo control se vieron diferencias en cuanto al nivel de expresión, siendo la expresión de CDH1, CDH3, BCL11a, GABRP y ligeramente en TP53, menor en la línea modificada con respecto del control. Por el contrario, se observó un ligero aumento en la expresión de PROM1 y EGFR, en la línea modificada, no observándose cambio ninguno en las proteínas SFRP1 y VIM, ya que esta línea carecía de la expresión de ambas.



**Figura 32. Inmunohistoquímica de los genes positivamente correlacionados con TRIM29 en la línea Basal modificada HCC3153 y su respectivo control.**

En la línea Basal HCC3153 se observó una clara disminución de los niveles de expresión de la proteína TRIM29, llegando a ser del 80-90%. En este caso se observa una disminución de la expresión de las proteínas CDH1, SFRP1, VIM y ligeramente en GABRP, en la línea celular modificada, comparándola con su control. Por otro lado, se observaron ciertos aumentos importantes de la expresión como en EGFR, siendo más ligero este aumento en TP53 y menos marcado en CDH3, en las células modificadas con respecto de sus controles. Finalmente, podemos decir que no observamos diferencia alguna en cuanto a los niveles de expresión de BCL11a y PROM1.

#### 4.6.6. Estudios de enriquecimiento funcional

Los diferentes genes relacionados con *TRIM29* presentaban múltiples funciones tal y como hemos descrito anteriormente. Con la finalidad de observar la implicación global de estos genes, se realizó un estudio de enriquecimiento funcional mediante la herramienta online EnrichR, a través de la cual se observó que los genes obtenidos se relacionaban con tejido epitelial gástrico, piel y mama (**Anexo 6**).

Mediante estos estudios *in silico* se observó que la disminución de expresión de genes como *TRIM29*, *GABRP*, *SFRP1*, *CDH3*, *SOSTDC1*, y *PROM1* estaba relacionado con enfermedades como el cáncer de mama, tal y como se observa en el resultado obtenido en el **Anexo 7**. Además, los genes relacionados positivamente con *TRIM29* se vieron implicados en procesos biológicos tales como la migración celular y en rutas implicadas en la proliferación, como se observa en las diferentes tablas de diversos experimentos obtenidos mediante la herramienta online EnrichR (**Anexo 8**). Por otra parte, estos genes presentan funciones moleculares basadas en la unión de cadherinas, y a diversos receptores desencadenantes de los procesos biológicos anteriormente explicados. Las proteínas anteriormente mencionadas se encuentran presentes en diferentes complejos, básicamente implicadas en procesos de apoptosis, como el complejo de proteínas Bax y Bcl-2, y en complejos encargados de la adhesión celular entre células (**Anexo 9**).

#### 4.6.7. Ensayos funcionales en líneas celulares de cáncer de mama

Después de estudiar el efecto de la disminución y aumento de los niveles de *TRIM29* en diferentes líneas celulares mesenquimales y basales, realizamos diversos experimentos con la finalidad de observar cambios funcionales provocados por la disminución de dicho gen. Por un lado, realizamos experimentos para observar la migración celular, así como la

## 4. Resultados

---

proliferación celular y los posibles cambios que pudieran aparecer en el ciclo celular.

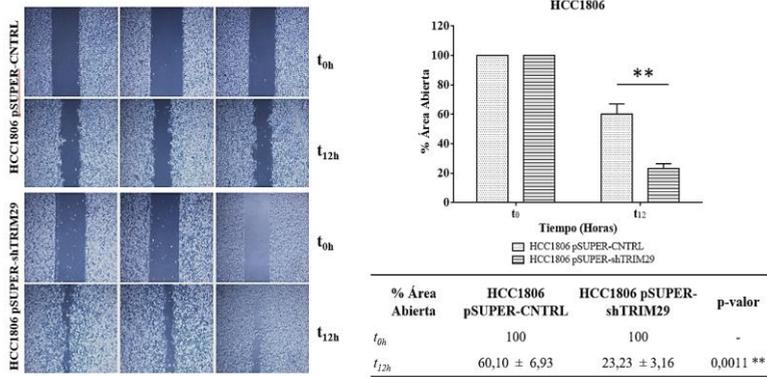
En los ensayos de inmunohistoquímica observamos que la sobreexpresión de *TRIM29* en las líneas mesenquimales se focaliza únicamente en la región perinuclear formando un aglomerado, pudiendo no realizar correctamente su función y obtener resultados erróneos. Por ello, únicamente realizamos los estudios funcionales con las líneas celulares basales HCC1806 y HCC3153, tanto aquellas líneas control como aquellas modificadas mediante shTRIM29.

### 4.6.7.1. *Wound Healing* de las líneas celulares

Con la finalidad de comprobar si la modificación de los niveles de expresión *TRIM29* afectaban a la migración de las células tumorales, realizamos un experimento de *Wound Healing*, o cierre de surco, en el que se produce una escisión en una monocapa de células y se observa el comportamiento celular en el cierre del surco realizado. Los resultados se muestran en la **Figura 33**.

Podemos ver que a las 12 horas la línea celular HCC1806 modificada con el shTRIM29 (**Figura 33. A**) presenta una mayor migración, y por lo tanto un porcentaje de área abierta menor que la línea CNTRL (p-valor=0,0011). Por otro lado, en la línea celular HCC3153 (**Figura 33. B**) no se observó ninguna diferencia significativa entre la línea CNTRL y la línea celular modificada con el shTRIM29, ya que, a las 12 horas, el desplazamiento del surco y el porcentaje de área abierta son semejantes en ambas líneas celulares (p-valor=0,465924).

A



B

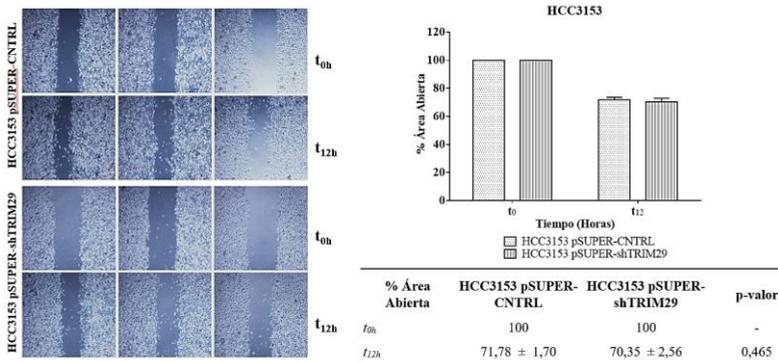


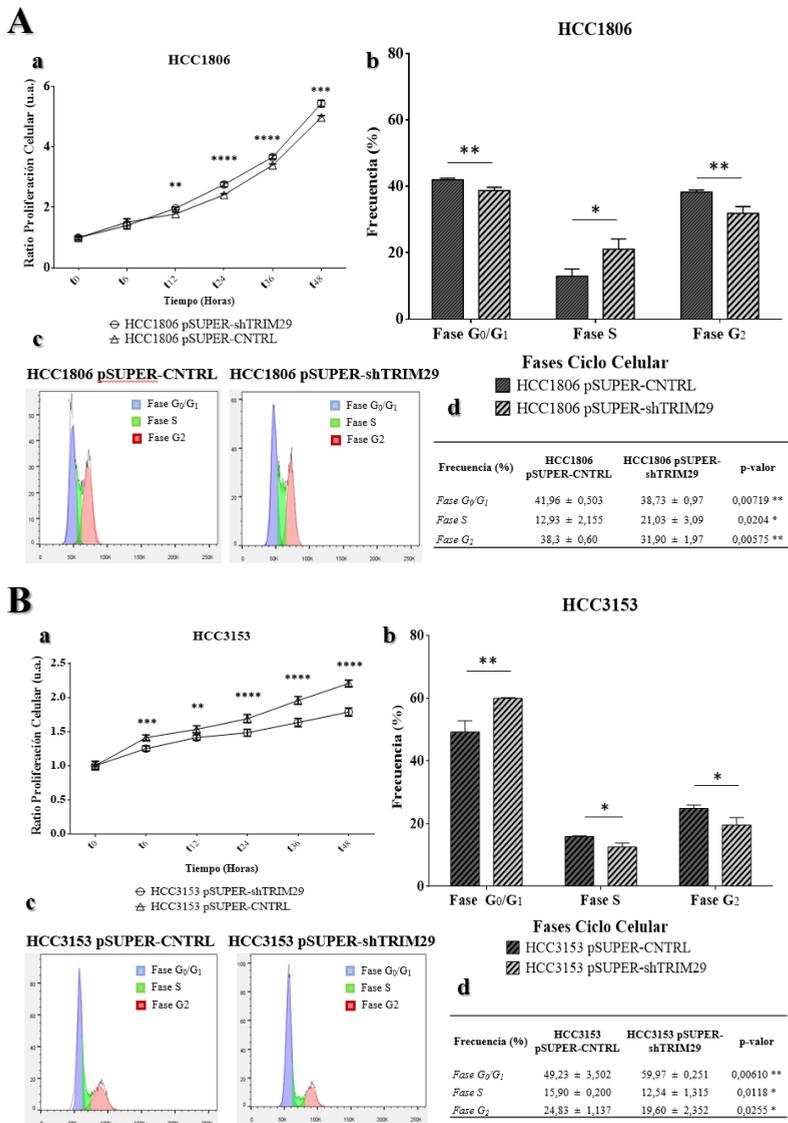
Figura 33. Estudio funcional de *Wound Healing* en las líneas celulares basales A) HCC1806 y B) HCC3153 con los niveles de TRIM29 disminuidos y sus respectivos controles, midiendo el área abierta restante 12 horas después de realizar el surco.

#### 4.6.7.2. Proliferación y ciclo celular de las líneas modificadas

La proliferación celular también puede determinar un peor pronóstico tumoral, por lo que queremos saber qué ocurre si se disminuye el nivel de *TRIM29* en aquellas líneas celulares que lo sobreexpresan. Para ello, se analizó el crecimiento de las líneas HCC1806 y HCC3153 modificadas y sus respectivos controles a diferentes tiempos desde 0 hasta 48 horas. Además,

## 4. Resultados

mediante citometría de flujo se estudió el ciclo celular de cada una de las líneas celulares, obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 34**.



**Figura 34.** Proliferación y ciclo celular en las líneas celulares basales A) HCC1806 y B) HCC3153 con los niveles de TRIM29 disminuidos y sus respectivos controles. a) Comparación de la proliferación en las líneas celulares CNTRL y shTRIM29, a diferentes tiempos (0h, 6h, 12h, 24h, 36h y 48h). b) Diferentes fases del ciclo celular en las líneas celulares CNTRL y en la shTRIM29. c) Perfil de ciclo celular en las líneas CNTRL y en la línea shTRIM29. d) Frecuencias del ciclo celular según sus fases en las líneas basales CNTRL y shTRIM29, en la que vemos diferencias significativas entre las diferentes fases de ambas líneas.

Al igual que en los tumores humanos, se aprecia que un bajo nivel de expresión de *TRIM29* se traduce en una mayor proliferación celular en la línea HCC1806, observándose diferencias significativas entre la línea control y la línea modificada desde las 12 horas hasta las 48 horas (**Figura 26.A-a**). Por citometría de flujo obtenemos un efecto que sigue los mismos pasos que los resultados obtenidos en la proliferación, ya que se observa una disminución estadísticamente significativa de la fase  $G_0/G_1$  en la línea celular modificada, presentando una mayor división. Además, se distingue una disminución en la fase S en la línea celular modificada con shTRIM29, con respecto de la línea celular control. Por último, observamos una disminución significativa en la fase  $G_2$  en la línea celular modificada (**Figura 34.A.b-d**).

Por otro lado, y al contrario que en la línea celular HCC1806, en la línea basal HCC3153, la disminución del nivel de expresión de *TRIM29* se traduce en una disminución del nivel de proliferación. Por ello, en este caso, la línea celular modificada por el shTRIM29 presenta un crecimiento menor que la línea control, obteniendo diferencias significativas desde las 6 hasta las 48 horas (**Figura 26.B.a**). Por citometría de flujo observamos que existe un aumento en la fase  $G_0/G_1$  en la línea modificada, existiendo diferencias significativas con respecto al control. Al contrario que en la fase anterior, en la fase S se aprecia una disminución significativa en la línea celular modificada. Finalmente, observamos una disminución en la fase  $G_2$  en la línea celular modificada, con diferencias estadísticamente significativas comparando con la línea control (**Figura 34.B.b-d**).

### 4.7. Estudios de respuesta a tratamientos con antraciclinas

En estudios previos del grupo, se demostró que la región 11q23 estaba, de algún modo, implicada en la respuesta frente a tratamientos con antraciclinas (Doxorubicina) en pacientes de cáncer de mama<sup>126</sup>. En este estudio, se demostró que las pacientes con delección en la región de 11q23 presentaban una mejor respuesta a los tratamientos con antraciclinas que aquellas pacientes que presentaban esta región normal. *TRIM29*, gen presente en dicha región, es nuestro candidato responsable de la diferencia de respuesta frente al tratamiento con antraciclinas, además, como se ha explicado previamente, la delección de *TRIM29* se ha visto asociada a radiosensibilidad en diferentes estudios<sup>140,178</sup>.

Con el objetivo de observar si *TRIM29* también estaba implicado en la reparación del ADN y de la resistencia frente a tratamientos con Doxorubicina se diseñaron experimentos de viabilidad/proliferación, apoptosis y se estudió la fosforilación y, la consecuente activación, de la histona H2AX, implicada en procesos de reparación del ADN.

#### 4.7.1. Viabilidad-Proliferación de las líneas celulares

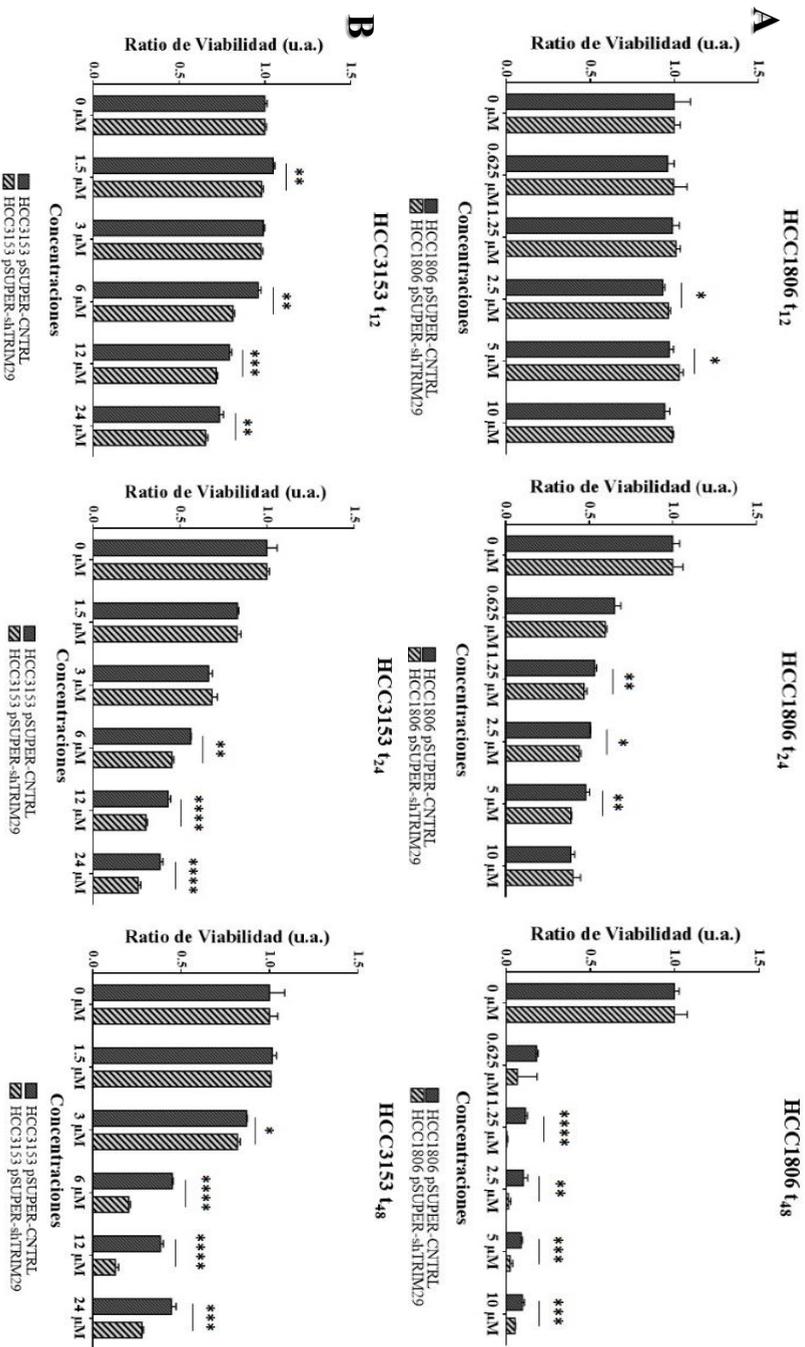
En primer lugar, se realizaron curvas de viabilidad/proliferación en las que tratamos las líneas celulares basales CNTRL, y sus respectivas células modificadas por sh*TRIM29*, a distintas concentraciones y a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 35**.

En primer lugar, estudiamos el efecto del fármaco sobre la línea basal HCC1806-CNTRL que, tal y como hemos visto, sobreexpresaba *TRIM29*, y la línea modificada HCC1806-sh*TRIM29*, en la que su expresión se veía notablemente reducida. El efecto del fármaco a las 12 horas era prácticamente nulo, únicamente obteniendo diferencias significativas entre la línea control y la modificada a 2,5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, aunque sin tener un alto nivel de significancia.

Transcurridas 24 horas, en la mayoría de los tratamientos a diferentes concentraciones existe una menor viabilidad en las células modificadas con *TRIM29* reducido, que, en las líneas control, existiendo diferencias significativas en las concentraciones 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ . Finalmente, a las 48 horas la viabilidad de todas las células es generalmente baja. A pesar de la baja viabilidad de ambas líneas celulares, se ven diferencias significativas entre ellas a concentraciones de 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , siendo la viabilidad más baja en las líneas con *TRIM29* disminuido (**Figura 35.A**).

Este estudio también se realizó con la línea celular basal HCC3153 CNTRL, que expresaba *TRIM29*, y la línea modificada HCC3153-shTRIM29, en la que la expresión de *TRIM29* se percibía notablemente reducida. En primer lugar, a las 12 horas se observaron diferencias de viabilidad significativas entre la línea control y la modificada con el shTRIM29 en las células tratadas con las concentraciones de Doxorubicina de 6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$  y 24  $\mu\text{M}$ . Una vez transcurridas 24 horas, la viabilidad de las células CNTRL era significativamente mayor que las modificadas por shTRIM29 a concentraciones de 6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$  y 24  $\mu\text{M}$ . Por último, a las 48 horas se apreció el mismo efecto que durante los tiempos anteriores, viéndose una menor viabilidad en aquella línea celular con la expresión de *TRIM29* reducida, a concentraciones de 3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$  y 24  $\mu\text{M}$  (**Figura 35.B**).

## 4. Resultados



**Figura 35.** Viabilidad celular en la línea A) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 a las 12 horas, 24 horas y 48 horas después de ser tratada con Doxorubicina a diferentes concentraciones (0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM y 10 µM). En este caso hemos determinado la concentración de 1,25 µM como la IC-50 de la línea celular HCC1806. Viabilidad celular en la línea basal B) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 a las 12 horas, 24 horas y 48 horas después de ser tratada con Doxorubicina a diferentes concentraciones (1,5 µM, 3 µM, 6 µM, 12 µM y 24 µM). En este caso hemos determinado la concentración de 6 µM como la IC-50 de la línea celular HCC3153.

#### 4.7.2. Apoptosis de las líneas modificadas

Una vez comprobado que el tratamiento con Doxorubicina afectaba más a aquellas líneas celulares con bajos niveles de *TRIM29*, pasamos a estudiar mediante citometría de flujo el efecto sobre la apoptosis celular. Por ello, se utilizó el marcador de apoptosis Anexina V unida a FitC para discriminar aquellas células que presentaban apoptosis, y el DAPI para observar aquellas células no viables. Mediante este experimento observaremos cuatro poblaciones celulares gracias a la combinación entre el DAPI y la AnexinaV-FitC. En primer lugar, las células viables (DAPI-/AnexinaV-FitC -); seguidamente, las células entrando en apoptosis las llamaremos Apoptosis Temprana (DAPI-/AnexinaV-FitC +); a continuación, las células más dañadas y que presentan un nivel de apoptosis mayor, o Apoptosis Tardía (DAPI+/AnexinaV-FitC+); y para terminar se las células completamente muertas o Necróticas (DAPI+/AnexinaV-FitC-). Las células basales utilizadas, correspondientes a las HCC1806, HCC3153 CNTRL y sus respectivas células modificadas, fueron tratadas con dos concentraciones cada una, correspondientes a la IC-50 y otra concentración diferente para observar si las diferencias eran más marcadas, tanto a tiempos de 24 como 48 horas (**Tabla 23, Figura 36 y Figura 37** para la línea HCC1806 y **Tabla 24, Figura 38 y Figura 39** para la línea HCC3153).

En primer lugar, realizamos los experimentos con la línea basal HCC1806, en las que observamos a las 24 horas diferencias entre las células control y modificadas, tanto a nivel de células viables, como de porcentajes de apoptosis temprana y tardía. Tanto en la concentración de 0.625  $\mu\text{M}$  (**Figura 36. B**), como 1.25  $\mu\text{M}$  (**Figura 36. C**) se aprecian diferencias significativas entre el control y la línea modificada en cuanto a viabilidad, siendo más baja en la modificada. Además, se contemplan diferencias significativas en el porcentaje de apoptosis temprana en la línea modifica con respecto al control. En la apoptosis tardía las diferencias significativas que se observan son

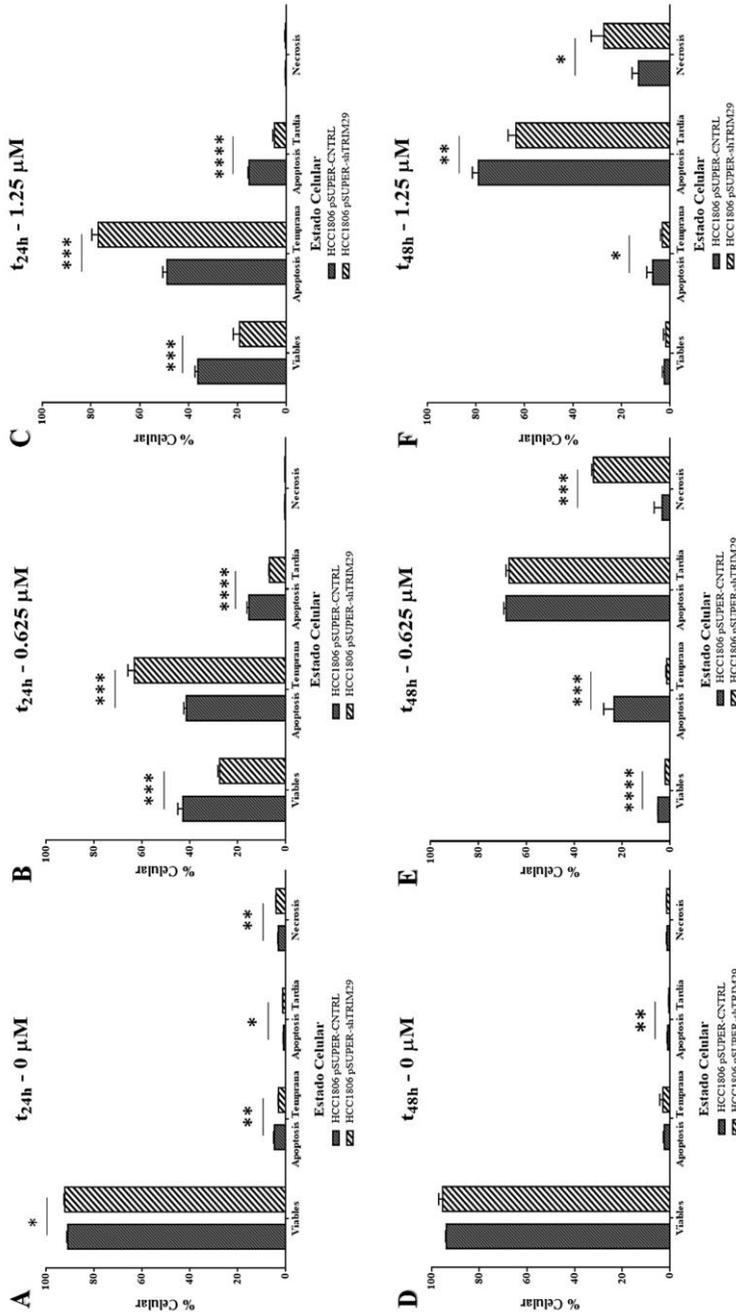
## 4. Resultados

inversas, ya que existe una mayor apoptosis tardía en las células control, con respecto de las modificadas.

A las 48 horas se aprecian diferencias significativas entre la línea HCC1806 control y la línea celular con los valores de *TRIM29* reducidos. En primer lugar, se observa que, el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía, así como en necrosis, es mayor en las células modificadas que en las células control, obteniendo valores altamente significativos. Observamos todas estas diferencias tanto en la concentración de 0.625  $\mu\text{M}$  (**Figura 36. E**), como 1.25  $\mu\text{M}$  (**Figura 36. F**), siendo estadísticamente significativas independientemente de la concentración elegida.

**Tabla 23.** Porcentaje de las diferentes poblaciones celulares (Células Viables, Apoptosis Temprana, Apoptosis Tardía, Necrosis) a 24 y 48 horas, en una concentración control y dos más a concentraciones de 0.625  $\mu\text{M}$  y 1.25  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, comparando entre la línea celular HCC1806 CNTRL y en la línea celular HCC1806 shTRIM29.

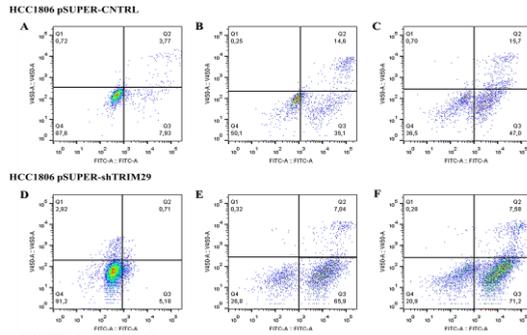
24 horas (%)	HCC1806 pSUPER-CNTRL	HCC1806 pSUPER-shTRIM29	p-valor
<b>Concentración (0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	90,92 $\pm$ 0,45	92,10 $\pm$ 0,404	0,018
<i>Apoptosis Temprana</i>	4,66 $\pm$ 0,45	2,970 $\pm$ 0,084	0,00314
<i>Apoptosis Tardía</i>	0,89 $\pm$ 0,16	1,20 $\pm$ 0,04	0,0337
<i>Necrosis</i>	3,01 $\pm$ 0,28	3,950 $\pm$ 0,134	0,00661
<b>Concentración (0,625 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	42,95 $\pm$ 2,05	27,53 $\pm$ 0,70	0,000249
<i>Apoptosis Temprana</i>	41,45 $\pm$ 1,05	63,2 $\pm$ 2,7	0,000201
<i>Apoptosis Tardía</i>	15,35 $\pm$ 0,85	6,760 $\pm$ 0,25	< 0,0001
<i>Necrosis</i>	0,290 $\pm$ 0,17	0,290 $\pm$ 0,11	0,978
<b>Concentración (1,25 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	36,23 $\pm$ 1,12	19,1 $\pm$ 2,61	0,000478
<i>Apoptosis Temprana</i>	48,93 $\pm$ 1,68	77,1 $\pm$ 2,65	0,000101
<i>Apoptosis Tardía</i>	15,25 $\pm$ 0,45	4,80 $\pm$ 0,73	< 0,0001
<i>Necrosis</i>	0,260 $\pm$ 0,13	0,37 $\pm$ 0,18	0,444
48 horas (%)	HCC1806 pSUPER-CNTRL	HCC1806 pSUPER-shTRIM29	p-valor
<b>Concentración (0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	93,93 $\pm$ 0,305	95,40 $\pm$ 1,587	0,19118
<i>Apoptosis Temprana</i>	2,470 $\pm$ 0,355	2,920 $\pm$ 1,404	0,618972
<i>Apoptosis Tardía</i>	1,030 $\pm$ 0,317	0,495 $\pm$ 0,166	0,0235078
<i>Necrosis</i>	1,350 $\pm$ 0,277	1,440 $\pm$ 0,156	0,661047
<b>Concentración (0,625 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	5,100 $\pm$ 0,030	2,005 $\pm$ 0,165	< 0,0001
<i>Apoptosis Temprana</i>	23,47 $\pm$ 4,285	1,400 $\pm$ 0,364	0,0008857
<i>Apoptosis Tardía</i>	68,62 $\pm$ 0,842	67,30 $\pm$ 1,308	0,160475
<i>Necrosis</i>	3,300 $\pm$ 3,353	32,03 $\pm$ 0,777	0,000133
<b>Concentración (1,25 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>Viables</i>	2,420 $\pm$ 0,734	1,790 $\pm$ 0,970	0,365315
<i>Apoptosis Temprana</i>	7,220 $\pm$ 2,505	3,190 $\pm$ 0,772	0,0264476
<i>Apoptosis Tardía</i>	79,10 $\pm$ 2,500	63,60 $\pm$ 3,253	0,0028204
<i>Necrosis</i>	13,13 $\pm$ 2,600	27,33 $\pm$ 5,180	0,0132223



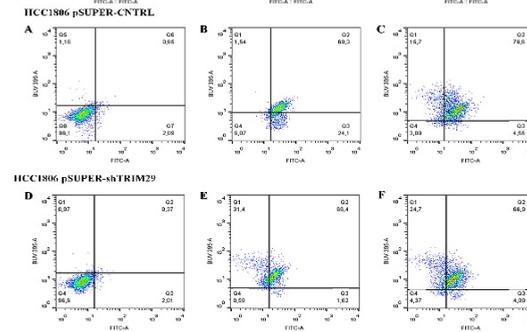
**Figura 36.** Estado de apoptosis y viabilidad de las células HCC1806 CNTRL y shTRIM29 tratadas a concentraciones de 0,625  $\mu M$  y 1,25  $\mu M$  de Doxorubicina, y un control sin tratar, a diferentes tiempos de 24 y 48 horas. A) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 sin tratamiento a las 24 horas, B) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 con a 0,625  $\mu M$  de Doxorubicina a las 24 horas, C) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 con a 1,25  $\mu M$  de Doxorubicina a las 24 horas, D) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 sin tratamiento a las 48 horas, E) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 con a 0,625  $\mu M$  de Doxorubicina a las 48 horas y F) HCC1806 CNTRL y shTRIM29 con a 1,25  $\mu M$  de Doxorubicina a las 48 horas.

## 4. Resultados

24 horas



48 horas



**Figura 37.** Perfiles de apoptosis en las líneas celulares HCC1806 CNTRL y shTRIM29 a las 24 y 48 horas con diferentes concentraciones de Doxorubicina. A) HCC1806 CNTRL sin tratamiento, B) HCC1806 CNTRL con 0,625  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, C) HCC1806 CNTRL con a 1,25  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, D) HCC1806 shTRIM29 sin tratamiento, E) HCC1806 shTRIM29 con a 0,625  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina y F) HCC1806 shTRIM29 con a 1,25  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina.

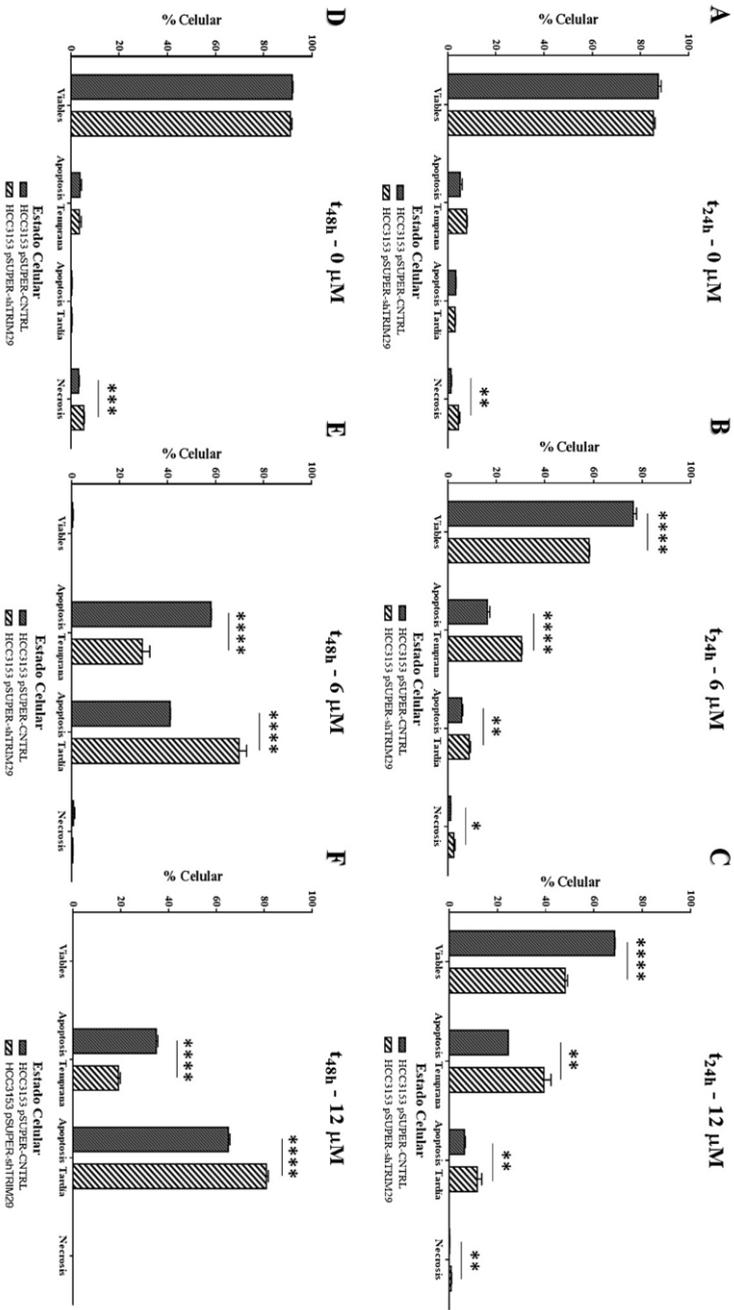
Siguiendo la misma tendencia que en la línea HCC1806, en la línea HCC3153 observamos que a las 24 horas ya se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre la línea control y la modificada en la fracción de células viables, siendo más bajo el porcentaje inicial de células vivas en aquellas células con los niveles de TRIM29 reducidos. Además, también apreciamos diferencias en los niveles de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, siendo los porcentajes en estas fracciones celulares mayores en las líneas modificadas con el shTRIM29, con respecto del la línea CNTRL. Estas diferencias se aprecian tanto en las células tratadas con una dosis de Doxorubicina de 6  $\mu\text{M}$  (**Figura 38. B**), como en las tratadas con una concentración de 12  $\mu\text{M}$  (**Figura 38. C**), aunque en esta última vemos unas diferencias más marcadas en los porcentajes de células viables.

A las 48 horas la totalidad de las células viables ha desaparecido, observándose únicamente una muy pequeña cantidad inapreciable en algunas de ellas. Por un lado, el porcentaje de células en apoptosis temprana era más alto en las células control que en las modificadas, siendo esta diferencia significativa entre ellas. Por otro lado, tanto en los porcentajes de apoptosis tardía como de necrosis, el porcentaje mayor de células corresponde con las células modificadas con niveles bajos de *TRIM29*. Estas diferencias aparecen significativas tanto en células tratadas con una concentración de 6  $\mu\text{M}$  (Figura 38. E) de Doxorubicina, como aquellas tratadas con una concentración de 12  $\mu\text{M}$  (Figura 38. F), observándose un efecto semejante.

**Tabla 24.** Porcentaje de las diferentes poblaciones celulares (Células Viables, Apoptosis Temprana, Apoptosis Tardía, Necrosis) a las 24 y 48 horas, en una concentración control y dos más a concentraciones de 6  $\mu\text{M}$  y 12  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, comparando entre la línea celular HCC3153 CNTRL y en la línea celular HCC3153 shTRIM29.

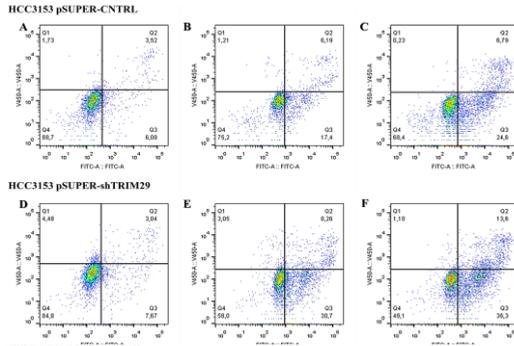
24 horas (%)	HCC3153 pSUPER-CNTRL	HCC3153 pSUPER- shTRIM29	p-valor
<b>Concentración (0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	87,55 $\pm$ 0,721	85,4 $\pm$ 1,15	0,0517
Apoptosis Temprana	5,23 $\pm$ 0,30	7,80 $\pm$ 0,85	0,00748
Apoptosis Tardía	3,39 $\pm$ 0,24	3,07 $\pm$ 0,13	0,109
Necrosis	1,38 $\pm$ 0,57	4,54 $\pm$ 0,31	0,00105
<b>Concentración (6 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	76,5 $\pm$ 0,25	58,25 $\pm$ 1,30	< 0,0001
Apoptosis Temprana	16,4 $\pm$ 0,30	30,40 $\pm$ 1,00	< 0,0001
Apoptosis Tardía	5,82 $\pm$ 0,56	8,825 $\pm$ 0,36	0,00151
Necrosis	1,23 $\pm$ 0,52	2,525 $\pm$ 0,03	0,013
<b>Concentración (12 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	68,5 $\pm$ 1,00	48,1 $\pm$ 0,15	< 0,0001
Apoptosis Temprana	24,6 $\pm$ 3,00	39,3 $\pm$ 0,00	0,00105
Apoptosis Tardía	6,40 $\pm$ 1,91	11,7 $\pm$ 0,39	0,0093
Necrosis	0,25 $\pm$ 0,17	0,930 $\pm$ 0,094	0,001
48 horas (%)	HCC3153 pSUPER-CNTRL	HCC3153 pSUPER- shTRIM29	p-valor
<b>Concentración (0 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	91,93 $\pm$ 0,379	91,17 $\pm$ 0,618	0,12293
Apoptosis Temprana	3,800 $\pm$ 0,600	3,515 $\pm$ 0,721	0,60822
Apoptosis Tardía	0,450 $\pm$ 0,089	0,412 $\pm$ 0,204	0,747174
Necrosis	3,22 $\pm$ 0,26	5,300 $\pm$ 0,316	0,000918787
<b>Concentración (6 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	0,450 $\pm$ 0,263	0,039 $\pm$ 0,040	0,054203
Apoptosis Temprana	58,13 $\pm$ 0,231	29,53 $\pm$ 3,092	< 0,0001
Apoptosis Tardía	41,13 $\pm$ 0,115	69,87 $\pm$ 3,060	< 0,0001
Necrosis	0,79 $\pm$ 0,49	0,537 $\pm$ 0,126	0,431078
<b>Concentración (12 <math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Viables	0,00825 $\pm$ 0,0165	0,0 $\pm$ 0,0	0,355918
Apoptosis Temprana	34,9205 $\pm$ 0,6185	19,025 $\pm$ 0,806	< 0,0001
Apoptosis Tardía	65,050 $\pm$ 0,635	80,975 $\pm$ 0,806	< 0,0001
Necrosis	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	-

## 4. Resultados

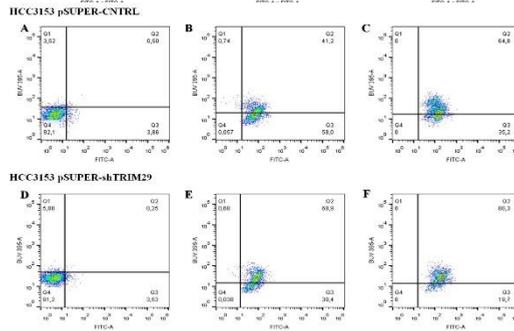


**Figura 38.** Estado de apoptosis y viabilidad de las células HCC3153 CNTRL y shTRIM29 tratadas a concentraciones de 6 μM y 12 μM de Doxorubicina, y un control sin tratar, a diferentes tiempos de 24 y 48 horas. A) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 sin tratamiento a las 24 horas, B) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 con a 6 μM de Doxorubicina a las 24 horas, C) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 con a 12 μM de Doxorubicina a las 24 horas, D) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 sin tratamiento a las 48 horas, E) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 con a 6 μM de Doxorubicina a las 48 horas y F) HCC3153 CNTRL y shTRIM29 con a 12 μM de Doxorubicina a las 48 horas.

24 horas



48 horas



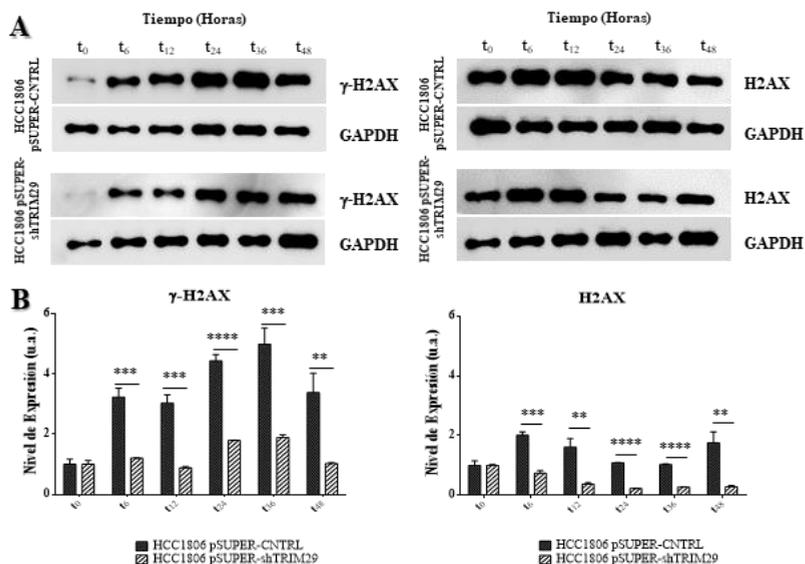
**Figura 39.** Perfiles de apoptosis en las líneas celulares HCC3153 CNTRL y shTRIM29 a las 24 y 48 horas con diferentes concentraciones de Doxorubicina. A) HCC3153 CNTRL sin tratamiento, B) HCC3153 CNTRL con 6  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, C) HCC3153 CNTRL con a 12  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina, D) HCC3153 shTRIM29 sin tratamiento, E) HCC3153 shTRIM29 con a 6  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina y F) HCC3153 shTRIM29 con a 12  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina.

#### 4.8. Resistencia a tratamientos con Doxorubicina mediante la fosforilación de $\gamma\text{-H2AX}$ y la activación de mecanismos de reparación

Una vez comprobado que TRIM29 estaba relacionado con la sensibilidad al tratamiento con Doxorubicina, terminamos nuestro estudio sobre este gen comprobando si la sensibilidad a este fármaco era debida a su implicación en la reparación del ADN frente al daño y a la rotura de la doble cadena. Para ello estudiamos la variación de los niveles tanto de la histona H2AX, como de su forma fosforilada  $\gamma\text{-H2AX}$ , activada cuando se produce daño al ADN.

## 4. Resultados

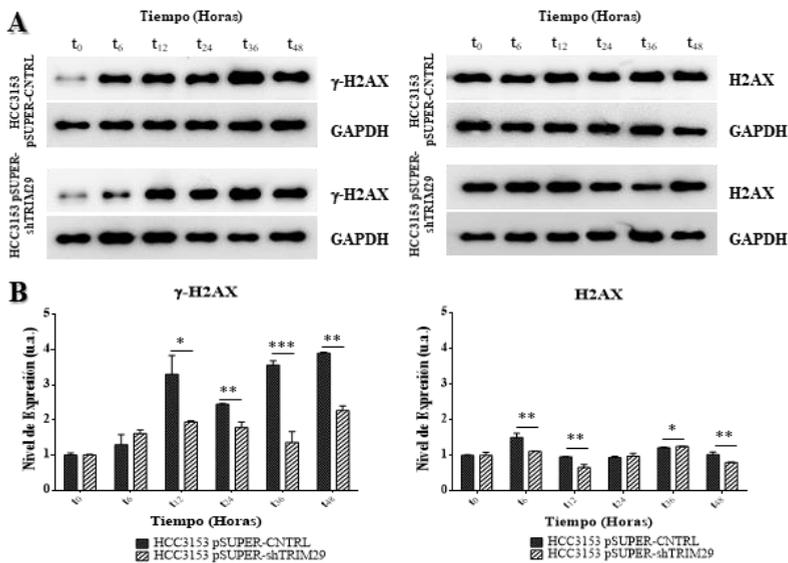
Los niveles de la histona H2AX y su forma fosforilada  $\gamma$ -H2AX fueron determinados mediante Western Blot. Las líneas celulares basales modificadas, HCC1806 y HCC3153, utilizadas durante los anteriores estudios, fueron tratadas con concentraciones de 2.5  $\mu$ M y 3  $\mu$ M, respectivamente a diferentes tiempos, en los que las células fueron recogidas y a partir de los cuales se estudió el nivel de proteína. En la **Figura 40** y **Figura 41** se muestran los resultados de las líneas basales HCC1806 y HCC3153 respectivamente.



**Figura 40.** Estudio del nivel expresión y fosforilación de la histona H2AX en la línea celular HCC1806 CNTRL y shTRIM29, como respuesta al daño al ADN producido por el tratamiento con Doxorubicina, a una concentración de 2,5  $\mu$ M a diferentes tiempos de 6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. A) Western Blot de  $\gamma$ -H2AX, H2AX y del control endógeno GAPDH de las líneas tratadas a diferentes tiempos. B) Cuantificación del Western Blot, donde se determina el nivel de expresión y la cantidad de  $\gamma$ -H2AX y H2AX.

En la línea celular HCC1806 hemos observado, que a medida que transcurre el tiempo de tratamiento, se percibe un aumento en la cantidad de histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX), como respuesta al daño al ADN producido por el fármaco. Como podemos observar en los experimentos de

Western Blot (**Figura 40. A**), en la línea control, en la cual se sobreexpresa el gen TRIM29, el aumento de la histona fosforilada es mayor que en la línea modificada con el shTRIM29, obteniendo diferencias altamente significativas entre ambas líneas durante todo el tiempo de tratamiento. Por otro lado, observamos que la cantidad de la histona H2AX aumenta pocas horas posteriores al tratamiento con Doxorubicina, disminuyendo su cantidad a medida que transcurre el tiempo. Como vemos en la figura anterior, en la línea control los niveles de H2AX aumentan mucho más que en la línea modificada, obteniendo también diferencias estadísticamente significativas (**Figura 40. B**).



**Figura 41. Estudio del nivel expresión y fosforilación de la histona H2AX en la línea celular HCC3153 CNTRL y shTRIM29, como respuesta al daño al ADN producido por el tratamiento con Doxorubicina, a una concentración de 3  $\mu$ M a diferentes tiempos de 6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. A) Western Blot de  $\gamma$ -H2AX, H2AX y del control endógeno GAPDH de las líneas tratadas a diferentes tiempos. B) Cuantificación del Western Blot, donde se determina el nivel de expresión y la cantidad de  $\gamma$ -H2AX y H2AX.**

En la línea celular HCC3153, al igual que en la línea celular HCC1806, percibimos que posteriormente al tratamiento con Doxorubicina, los niveles de  $\gamma$ -H2AX aumentan a medida que transcurre el tiempo de tratamiento, como respuesta al daño sobre el ADN producido por el fármaco

#### 4. Resultados

---

(**Figura 41. A**). En este caso observamos diferencias estadísticamente significativas a partir de las 12 horas (**Figura 41. B**). La línea control, la cual sobreexpresa TRIM29 de manera normal, presenta unos niveles más elevados de la histona fosforilada, comparándola con la línea celular modificada con el shTRIM29. Finalmente, observamos la fracción no fosforilada de la histona H2AX, obteniendo ciertas diferencias significativas entre la línea control y la línea modificada, contemplando que los niveles en ésta última línea celular eran más baja a tiempos de 6, 12 y 24 horas, y más altos a las 36 horas.

## ***5. Discusión***



## 5. DISCUSIÓN

El gen TRIM29 se ha visto relacionado de manera dual con diferentes tipos de cáncer en el organismo, actuando como oncogén en cáncer de páncreas<sup>150,151</sup>, vejiga<sup>156,157</sup>, pulmón<sup>179-181</sup>, cèrvix<sup>160</sup>, esófago<sup>182</sup>, tiroides<sup>158</sup>, osteosarcoma<sup>183</sup>, cáncer gástrico<sup>184</sup>, nasofaríngeo<sup>185</sup> y como supresor de tumores principalmente en cáncer de mama<sup>162-164</sup>, tal y como han recogido algunos trabajos durante los últimos años<sup>134</sup>. *TRIM29* no solo tiene una función protegiendo o favoreciendo la formación de tumores, sino que también se ha visto que presenta un papel fundamental en el proceso de la reparación del ADN como respuesta al daño por radiación, estando relacionado con las histonas que se activan como consecuencia de rotura de doble hebra del ADN como H2AX<sup>178</sup>. *TRIM29* se localiza en la región 11q23.3, cuya delección en pacientes se vio relacionada con una mejor respuesta al tratamiento con antraciclina como Doxorubicina<sup>126</sup>.

En nuestro estudio, a partir de datos de un *array* aCGH, descubrimos que existe una asociación entre el estado genómico de la región cromosómica 11q23.3, en la que está presente el gen candidato, *TRIM29*, y los diferentes subtipos de cáncer de mama, agrupados como luminales, basales y mesenquimales (o Claudin-Low), en una población de 53 líneas celulares. La asociación está basada en la diferencia en los niveles de delección, normalidad o ganancia de la región entre los distintos subtipos. Las líneas luminales y mesenquimales estaban caracterizadas por presentar un número de copias normal o presentar delección del gen; por el contrario, en las líneas basales predominaba una ganancia del gen. Aquellas líneas celulares del subtipo Basal que mostraban una sobreexpresión de *TRIM29* no mostraron amplificación génica tras ser analizadas mediante FISH como podría esperarse. Se detectó que una copia de *TRIM29* se encontraba translocada a un cromosoma distinto al 11 en las líneas celulares HCC1937, HCC3153 y HCC1806, lo que sugiere que la activación del gen podría deberse a un reordenamiento cromosómico, fenómeno bastante común en tumores sólidos<sup>186,187</sup> pero que no ha sido descrito

## 5. Discusión

---

hasta la fecha en el caso del gen *TRIM29*. Dentro del subtipo Luminal también se observó una translocación en la línea celular ZR-75-1 en una de sus copias, no detectando expresión de *TRIM29* en esta línea. Por último, en la línea Mesenquimal MDAMB-231 describimos una translocación, desde la región cromosómica 11q23.3 hasta el brazo corto del cromosoma 15, descrita previamente por el grupo de Lu y, *et al*<sup>171</sup>, donde se determina una translocación del gen *ATM* presente en la región 11q22-23 hasta 15p. En nuestro trabajo describimos por primera vez que la translocación de esta región se produce exactamente a nivel del gen *TRIM29*. La translocación descrita se diferencia de la descrita por Sherif Z *et al.*<sup>172</sup> en que no existe una translocación recíproca entre las regiones 11q23 y 15q15, sino que únicamente se observa la fusión de 11q23 con 15p. El estudio de Hayette, S. *et al*<sup>188</sup> describía una fusión entre *ATM* y *MLL*, por lo que hipotetizamos la posibilidad de encontrar la fusión con algunos de los genes de la región 15p, hecho que está siendo estudiado actualmente mediante datos presentes en bases de datos de RNA-Seq, y que una vez obtenidos puede ser que describan una nueva fusión. Del mismo modo, las translocaciones de *TRIM29* en las líneas basales también van a ser estudiadas en futuros experimentos para descubrir una posible fusión del gen con una región promotora que permita la expresión, o sobreexpresión, del gen.

A partir de los datos clínicos de los pacientes realizamos dos grupos en base al estado de receptores hormonales positivos o receptores hormonales negativos. En nuestro estudio describimos la asociación del estado de *TRIM29* con los diferentes grupos, al igual que en el trabajo de Climent J *et al*<sup>126</sup>, con la diferencia de que en nuestro estudio la relación no viene dada por una región genómica grande como 11q23, sino que viene determinada únicamente por la región correspondiente al gen *TRIM29*. El grupo de receptores hormonales negativos está relacionado de manera general con un peor pronóstico<sup>189</sup>, una mayor recaída y por lo tanto una menor supervivencia, debido a una mayor proliferación, mayor migración e invasión, lo que tiene como significado un mayor potencial tumorigénico<sup>59,62,190-192</sup>.

Por otro lado, observamos que los diferentes subtipos de cáncer de mama se pueden agrupar en base a la expresión de TRIM29, apareciendo más expresado en las líneas basales, que en las mesenquimales y luminales. En el trabajo publicado por Sorlie *et al.*<sup>55</sup> el gen *TRIM29* ya pertenecía al grupo de genes, con los que se consiguió agrupar el cáncer de mama en diferentes subtipos como Luminal A, Luminal B, Luminal C, HER2 amplificado, Basal-like y Normal-like; utilizándose de nuevo este gen en el estudio de Sorlie *et al* de 2003<sup>54</sup>, por lo que nuestros resultados siguen la misma tendencia que los publicados anteriormente. La novedad de nuestros resultados está basada en que la expresión de *TRIM29* diferencia dos subgrupos diferentes dentro del subtipo basal, que se agrupan según el nivel de proliferación celular. Además, en nuestro estudio no sólo hemos visto que *TRIM29* agrupa los diferentes subtipos de cáncer de mama según el estado del gen y los niveles de expresión, sino que también agrupa según el estado de metilación de la región promotora del gen. Se observó una mayor metilación del promotor de *TRIM29* en el subtipo Luminal y Mesenquimal, frente al Basal, donde las líneas aparecen en su mayoría hipometiladas, al igual que se demostraba en el trabajo de Avraham A, *et al.*<sup>166</sup>. Este resultado podría explicar que las diferencias en la expresión de *TRIM29*, podrían deberse al estado de metilación del promotor y regiones cercanas. En nuestro estudio no solo se han estudiado las regiones CpG presentes en el promotor de *TRIM29*, sino también las regiones CpG cercanas al promotor, pre-promotora, para tener una visión más amplia del nivel de metilación de la región reguladora de nuestro gen. Este nivel diferencial de metilación explica parcialmente la existencia de diferentes niveles de expresión del gen *TRIM29* según el subtipo celular, descritos anteriormente, y confirmados mediante estudios de expresión por proteína.

Mediante receptores hormonales de Estrógenos y Progesterona, del receptor ERBB2, y de Ki67, se consiguió reclasificar en diferentes subtipos 97 tumores de cáncer de mama y estudiar la expresión de TRIM29 en dichos tumores y en 23 muestras de tejido sano. En esta población encontramos que una menor expresión de TRIM29 se asociaba, no sólo con los subtipos Luminal

A y Triple Negativo, sino también con el nivel proliferativo tumoral, ya que en el momento en el que dividimos los subtipos según su nivel proliferativo, la pérdida de expresión de TRIM29 se asociaba con valores de Ki67 más elevados. Finalmente, agrupando todos los tumores según su nivel proliferativo, demostramos que la asociación entre TRIM29 y el nivel proliferativo tumoral era notable. Estos resultados encontrados en tumores de cáncer de mama difieren del resto de tumores en los que se ha estudiado previamente la expresión de TRIM29, en los que se describe que una mayor expresión se asocia con un índice proliferativo mayor, y por lo tanto con peor pronóstico<sup>151,157,158,160,161,179,180,182,184,185</sup>. A pesar de ello, nuestros resultados siguen la tendencia de aquellos trabajos publicados en cáncer de mama por diversos autores, en los que se describe que una disminución de los niveles de TRIM29 están asociados con una mayor proliferación y peor pronóstico<sup>162-164</sup>. Nuestros resultados refuerzan, por lo tanto, los estudios previos donde se asocia TRIM29 con un buen pronóstico tumoral, y pone de evidencia el papel dual que presenta este gen dependiendo del origen del tejido tumoral.

Tal y como describen previamente los trabajos de Sorlie<sup>54,55</sup>, la expresión de *TRIM29* fue uno de los componentes, entre mucho otros, mediante los cuales se consiguió subclasificar los tumores mamarios en distintos subtipos moleculares. Nosotros describimos que esta expresión viene determinada por diferentes factores, como un número diferencial del número de copias entre los distintos subtipos y un diferente nivel de metilación del promotor según el subtipo molecular. Por ello, estas técnicas pueden ser también utilizadas en la clasificación tumoral en aquellos casos en los que no se pudiera disponer de material genético como ARN de calidad, necesitando únicamente muestras de ADN. Además, el nivel de expresión de *TRIM29* puede ser también un indicador de agresividad tumoral, pudiendo definir en parte el nivel de proliferación tumoral en pacientes de cáncer de mama.

La notable diferencia de expresión de *TRIM29* entre los diferentes subtipos, y entre algunas líneas del mismo subtipo, y su relación con los niveles

proliferativos tumorales anteriormente explicados en pacientes, nos hacía preguntarnos si existía relación alguna con genes relacionados con un peor pronóstico tumoral como la proliferación, migración e invasión. El análisis bioinformático de correlación génica de *TRIM29* determinó una relación positiva de *TRIM29* con genes como E-Cadherina (*CDH1*), el cual presentaba básicamente funciones de adhesión celular, es considerado un marcador epitelial<sup>193</sup>, y se ha relacionado con la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>194</sup>, con la clasificación de los subtipos celulares<sup>195</sup> y con la progresión tumoral<sup>196</sup>; P-Cadherina (*CDH3*) implicado también en la adhesión celular<sup>197</sup>, se ha relacionado con la migración, proliferación tumoral, el estado de células madre tumorales y la metástasis<sup>194,198</sup>; *Sclerostin domain containing 1 (SOSTDC1)*, identificado como regulador indirecto de la ruta de las  $\beta$ -cateninas<sup>199</sup>, se ha visto relacionado en cáncer de tiroides en la proliferación, migración y el proceso de transición epitelio-mesenquimal<sup>200</sup> a través de la ruta PI3K/Akt y MAPK/Erk; *Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)*, descrito como antagonista de Wnt<sup>201</sup>, se ha visto relacionado con la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenin en cáncer de colon y en carcinoma escamoso oral<sup>202,203</sup>, en adenocarcinoma rectal<sup>204</sup>, en cáncer de pulmón<sup>205</sup> protegiendo frente a la proliferación tumoral<sup>206</sup> y en cáncer de vejiga relacionado con la proliferación, migración e invasión<sup>207</sup>; *Prominin-1 (PROM1* o CD133), relacionado con las células madre tumorales<sup>208,209</sup>; *B-Cell CLL/Lymphoma 11A (BCL11a)*, marcador de cáncer de mama triple negativo, relacionado con células madres tumorales<sup>210</sup>, relacionado con la recaída en el cáncer de células escamosas<sup>211</sup> y en diferentes enfermedades hematológicas como en leucemia mieloide aguda<sup>212</sup> y en la leucemia mieloide crónica<sup>213</sup>; y por último  *$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor (GABRP)*, relacionado con la progresión, grado tumoral<sup>214,215</sup>, y con un fenotipo agresivo de cáncer ovárico<sup>216</sup>. La validación de los genes positivamente correlacionados con *TRIM29* mediante estudios funcionales no fue concluyente, por lo que no podemos asegurar que dichos genes estén directamente relacionados con *TRIM29*, pero hipotetizamos que *TRIM29* puede regular indirectamente a los genes estudiados a través de otros

## 5. Discusión

---

genes no seleccionados en este estudio. También hipotetizamos la posibilidad de que estos genes pueden estar relacionados con *TRIM29*, pero pueden presentar una posición *upstream*, por lo tanto, al realizar la modificación de los niveles de expresión de *TRIM29*, los niveles de estos genes pueden no verse alterados. En experimentos *in silico* de enriquecimiento funcional mediante la herramienta EnrichR, los genes previamente descritos se vieron relacionados con procesos de diferenciación celular, crecimiento, migración, adherencia y rutas apoptóticas, observando así, funciones semejantes previamente publicadas y descritas.

A través de los experimentos realizados en las líneas celulares donde se ha disminuido la expresión de *TRIM29* hemos determinado la relación existente entre este gen y la capacidad proliferativa de las células. A pesar de ello, en dos líneas celulares de cáncer de mama basales de distintos subtipos<sup>80</sup> observamos resultados completamente distintos. Por una parte, utilizamos la línea del subtipo Basal-like 1 (BL1), HCC3153 y por otro lado la línea del subtipo Basal-like 2 (BL2), HCC1806. En primer lugar, la línea celular HCC1806 con los niveles de *TRIM29* disminuidos presentaba un crecimiento y una migración mayor que su control, lo que reproduce en cierta medida aquello observado en la inmunohistoquímica de los pacientes, donde la proliferación se asociaba con pacientes con una menor expresión de *TRIM29*. Estos resultados validan de nuevo funciones previamente descritas sobre el papel protector de *TRIM29* en cáncer de mama<sup>162-164</sup>, y en cáncer de hueso<sup>217</sup>. Por otro lado, la línea celular HCC3153 con los niveles de *TRIM29* disminuidos presentaba un crecimiento menor y no se observaron cambios en el nivel de migración celular, al comparar los resultados obtenidos entre esta línea y su control. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que, aunque ambas líneas celulares son basales, pertenecen a subtipos celulares distintos con características fenotípicas totalmente diferentes<sup>80</sup>. Estos resultados reproducen otros similares vistos en otros tipos tumorales, donde *TRIM29* se presenta como un oncogén en experimentos semejantes a los realizados en el presente trabajo<sup>157,158,160,161,179,182,184,185</sup>.

La diferente respuesta encontrada al disminuir los niveles de *TRIM29* entre las líneas celulares HCC1806 y HCC3153 es evidente, y pone otra vez de manifiesto el papel dual de dicho gen, observando disparidad en su función dependiendo del subtipo de línea celular Triple negativa estudiada. Existen abundantes diferencias entre los distintos subtipos presentes dentro del subtipo de células Basal-like, entre las que se encuentran nuestras líneas celulares. Las diferencias se basan por una parte en mutaciones del gen *BRCA1*, y *TP53*, además presentan diferencias en cuanto a la expresión de genes del ciclo celular, división y respuesta frente al daño al ADN, siendo estas características más comunes del subtipo BL1. Las rutas de señalización como Wnt/b-cateninas, rutas de señalización relacionadas con factores de crecimiento, una mayor expresión de *EGFR*, *MET* y *TP63*, y presentar un origen más basal/mioepitelial, son características más comunes del subtipo BL2<sup>80</sup>, por lo que podemos hipotetizar que incluso en un mismo subtipo tumoral (Basal-like) la modificación génica de un biomarcador puede tener efectos opuestos en base a el resto de características moleculares de las propias células. En diversos estudios se ha demostrado que la variabilidad en la efectividad de la respuesta a diversos fármacos puede deberse a las diferentes características de los distintos subtipos de tumores Basal-like, como es el caso del Cisplatino e inhibidores PARP en el subtipo BL1, e inhibidores de mTOR y de factores de crecimiento en el subtipo BL2<sup>218</sup>. Por ello, la disminución de la expresión de *TRIM29*, puede conllevar la observación de diferentes efectos en los diferentes subtipos Triple negativo.

Tal y como demostramos en la presente tesis doctoral, *TRIM29* presenta un efecto funcional distinto en diferentes líneas celulares basales, así como entre los diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, observamos una función que es común, independientemente del subtipo de cáncer de mama, e incluso del tipo de cáncer, como es la protección frente al daño al ADN<sup>152,178,219</sup>. Hemos demostrado que *TRIM29* protege a las células frente al daño al ADN, pero no solo debido al daño por irradiación ionizante, como se ha descrito previamente, sino que describimos por primera vez que *TRIM29*

## 5. Discusión

---

participa en la función de reparación del ADN frente al daño producido por tratamientos con Doxorubicina. Hemos observado que en líneas celulares basales con los niveles de TRIM29 disminuidos, existe una mayor sensibilidad al fármaco que sus respectivos controles. Estudiando los niveles de apoptosis de las líneas celulares modificadas y sus respectivos controles demostramos que las líneas celulares con los niveles de *TRIM29* disminuidos, tratadas con diferentes dosis de Doxorubicina y a diferentes tiempos, presentan una mayor predisposición a entrar en estado apoptótico, acentuándose este efecto a dosis más altas y a tiempos más largos, llegando a presentar una mayor necrosis, comparando con sus respectivos controles. Este hecho demuestra que TRIM29 está implicado de alguna manera en la respuesta al efecto producido por la Doxorubicina y muy posiblemente en la protección frente al daño al ADN.

En diversos trabajos previos se describe que la relación entre TRIM29 y el proceso de reparación del ADN se debía a la interacción entre TRIM29 y la histona H2AX<sup>219,220</sup>. La unión de TRIM29 a la cromatina era una acción básica para la fosforilación en la Ser139 ( $\gamma$ -H2AX) y la activación de dicha histona como respuesta al daño al ADN<sup>178</sup>. La relación encontrada en nuestro trabajo entre TRIM29 y H2AX, sigue la tendencia de los resultados previamente publicados, sobre la protección del daño al ADN, con la diferencia de que en nuestro caso hemos conseguido observar dicha relación tratando las células con Doxorubicina y no mediante irradiación. Observamos, por lo tanto, que los niveles de fosforilación de  $\gamma$ -H2AX aumentan a medida que transcurre el tiempo de tratamiento. Los resultados obtenidos confirman aquellos encontrados, y en los que nos basamos para empezar nuestro estudio<sup>126</sup>, en los cuales se describía que aquellas pacientes con delección en la región cromosómica 11q23 presentaban una mejor respuesta frente a tratamientos con antraciclinas. Describimos a *TRIM29*, presente en la región cromosómica 11q23.3 como el gen responsable de la resistencia frente a fármacos como Doxorubicina, es decir, la ausencia de *TRIM29* hace que las células tumorales sean más sensibles a los tratamientos por Doxorubicina. Por ello, *TRIM29*

podría proponerse como un gen de predicción de la respuesta a fármacos como Doxorubicina.

Los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral, nos indican que *TRIM29* puede ser un buen gen para ayudar a agrupar y diferenciar los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, tanto a nivel genómico (mediante el estado del gen), como epigenómico (mediante el nivel de metilación) y según su nivel de expresión. Además, hemos demostrado que *TRIM29* está relacionado directamente con los niveles de proliferación en tumores de cáncer de mama, sobre todo en los subtipos Luminal B y Triple-Negativo. En cuanto a la relación de *TRIM29* con el resto de genes, podemos decir que no lo encontramos directamente relacionado con genes, sino que lo encontramos indirectamente relacionado con una serie de procesos correspondientes con la adhesión celular y procesos de regulación de rutas de señalización Wnt/ $\beta$ -cateninas, implicado en su conjunto en procesos de proliferación, migración e invasión. Por ello, observamos diferencias en la proliferación y migración en líneas celulares con los niveles de *TRIM29* disminuidos, y también entre diferentes subtipos dentro del subtipo Basal-like. Para terminar, describimos por primera vez a *TRIM29* como un elemento clave en procesos de reparación del ADN, formando parte del complejo que ayuda a activar el sistema a través de la fosforilación de la histona H2AX, como respuesta al tratamiento con un fármaco utilizado en la clínica perteneciente al grupo de las antraciclinas como es la Doxorubicina.



## ***6. Conclusiones***



## 6. Conclusiones

---

1. Los niveles de expresión del gen *TRIM29*, localizado en la región cromosómica 11q23.3, están asociados con los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama. La expresión viene determinada por diferencias en el número de copias, y en los niveles de metilación entre los diferentes subtipos.
2. La función de *TRIM29* presenta un papel dual en líneas celulares, en cuanto al nivel de proliferación y migración, dependiendo del subtipo Triple negativo estudiado.
3. En pacientes con cáncer de mama la expresión de *TRIM29* se asocia con una menor proliferación tumoral, independientemente del subtipo molecular, y por lo tanto con tumores de mejor pronóstico.
4. Bajos niveles *TRIM29* se asocian con una mayor sensibilidad a tratamientos con Doxorubicina, debido a su función en la protección frente al daño al ADN.
5. La interacción de *TRIM29* con la histona H2AX, permite su fosforilación ( $\gamma$ -H2AX) y su consecuente activación, permitiendo el inicio de los mecanismos implicados en la reparación del ADN.



## ***7. Bibliografía***



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Robinson, V. *The Story of Medicine. New Home Library* (1944).
2. Fielding, G. *An introduction to the History of Medicine: with medical chronology, suggestions for study and biographic data. Philadelphia W.B. Saunders* (1921).
3. Graña, A. Brief historical evolution of cancer. *5*, 26–31 (2015).
4. American Breast Cancer Society. Breast Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html> (2017).
5. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. (2007). Available at: <https://www.cancer.gov/types/breast>.
6. Boyle, P. The globalisation of cancer. *Lancet (London, England)* 368, 629–30 (2006).
7. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108 (2015).
8. González, J. R. *et al.* Probability of developing and dying of cancer in Catalonia during the period 1998-2001. *Med. Clin. (Barc)*. 124, 411–4 (2005).
9. Chlebowski, R. T. *et al.* Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women’s Health Initiative Observational Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 526–35 (2013).
10. Colditz GA, Baer HJ, T. R. *Breast Cancer. Cancer epidemiology and prevention* (Oxford University Press, 2006). doi:10.1093/acprof:oso/9780195149616.001.0001
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, M. C. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *GLOBOCAN 2012 v1.0 No. 11* (2012). Available at: from: <http://globocan.iarc.fr>.
12. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30 (2016).
13. Althuis, M. D. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int. J. Epidemiol.* 34, 405–412 (2005).
14. Lluch, A. Bases genómicas del cáncer. Hacia una medicina personalizada del Cáncer de Mama. 1–107 (2014).
15. Bosetti, C. *et al.* The decline in breast cancer mortality in Europe: an update (to 2009). *Breast* 21, 77–82 (2012).

## 7. Bibliografia

---

16. Berry, D. A. *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1784–92 (2005).
17. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).
18. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–74 (2011).
19. Prat, A. *et al.* Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* 142, 237–55 (2013).
20. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68 (2010).
21. Tomao, F. *et al.* Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Oncol. Targets. Ther.* 8, 177–93 (2015).
22. Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 15, 907–13 (2009).
23. Prat, A. & Perou, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* 15, 842–4 (2009).
24. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5–23 (2011).
25. Marusyk, A. & Polyak, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 105–17 (2010).
26. Weigelt, B., Baehner, F. L. & Reis-Filho, J. S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.* 220, 263–80 (2010).
27. Sotiriou, C. & Pusztai, L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 360, 790–800 (2009).
28. van 't Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530–6 (2002).
29. Wang, Y. *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet (London, England)* 365, 671–9 (2005).
30. Kim, C. & Paik, S. Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 340–7 (2010).

31. Ma, X.-J. *et al.* A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 2601–8 (2008).
32. Munkácsy, G., Szász, M. A. & Menyhárt, O. Gene expression-based prognostic and predictive tools in breast cancer. *Breast Cancer* 22, 245–52 (2015).
33. van de Vijver, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1999–2009 (2002).
34. Ma, X.-J. *et al.* A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5, 607–16 (2004).
35. Wirapati, P. *et al.* Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 10, R65 (2008).
36. Fan, C. *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 560–9 (2006).
37. Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Fumagalli, D. & Sotiriou, C. Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Sci. Transl. Med.* 2, 47ps43 (2010).
38. Reyat, F. *et al.* A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10, R93 (2008).
39. Desmedt, C. *et al.* Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin. Cancer Res.* 14, 5158–65 (2008).
40. Iwamoto, T. *et al.* Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 264–72 (2011).
41. Iwamoto, T. & Pusztai, L. Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? *Genome Med.* 2, 81 (2010).
42. Sotiriou, C. *et al.* Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 262–72 (2006).

## 7. Bibliografia

---

43. Toussaint, J. *et al.* Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics* 10, 424 (2009).
44. Paik, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 2817–26 (2004).
45. Paik, S. *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 3726–34 (2006).
46. Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* 5, 2929–43 (2015).
47. Teschendorff, A. E. & Caldas, C. A robust classifier of high predictive value to identify good prognosis patients in ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10, R73 (2008).
48. Tamimi, R. M. *et al.* Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10, R67 (2008).
49. Carey, L. A. *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295, 2492–502 (2006).
50. Cheang, M. C. U. *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* 14, 1368–76 (2008).
51. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 736–50 (2009).
52. Yang, X. R. *et al.* Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 439–43 (2007).
53. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752 (2000).
54. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8418–23 (2003).
55. Sørli, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–74 (2001).

56. Nielsen, T. O. *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 5367–74 (2004).
57. Parker, J. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 27, 1160–7 (2009).
58. Hu, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7, 96 (2006).
59. Reis-Filho, J. S. & Pusztai, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet (London, England)* 378, 1812–23 (2011).
60. Weigelt, B. *et al.* Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 65, 9155–8 (2005).
61. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76 (2007).
62. Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698–707 (2012).
63. Penault-Llorca, F. & Radošević-Robin, N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* 49, 166–171 (2017).
64. Kennecke, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* 28, 3271–7 (2010).
65. Dowsett, M. *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1656–64 (2011).
66. Parker, J. *et al.* Breast Cancer Molecular Subtypes Predict Response to Anthracycline/Taxane-Based Chemotherapy. *Cancer Res.* 69, 2019–2019 (2009).
67. Staaf, J. *et al.* Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J. Clin. Oncol.* 28, 1813–20 (2010).
68. Piccart-Gebhart, M. J. *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1659–72 (2005).

## 7. Bibliografia

---

69. Gianni, L. *et al.* Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet. Oncol.* 12, 236–44 (2011).
70. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–92 (2001).
71. Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J. R. & Lluch, A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat. Rev.* 36, 206–15 (2010).
72. Livasy, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 19, 264–71 (2006).
73. Smid, M. *et al.* Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 68, 3108–14 (2008).
74. Kreike, B. *et al.* Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 9, R65 (2007).
75. Dent, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13, 4429–34 (2007).
76. Rouzier, R. *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 5678–85 (2005).
77. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* 361, 123–34 (2009).
78. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 69, 4116–24 (2009).
79. Weigelt, B. *et al.* Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet. Oncol.* 11, 339–49 (2010).
80. Lehmann, B. D. B. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750–67 (2011).
81. Burstein, M. D. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 1688–1698 (2015).
82. Jézéquel, P. *et al.* Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res.* 17, 43 (2015).

83. Ahn, S. G., Kim, S. J., Kim, C. & Jeong, J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 19, 223–230 (2016).
84. Masuda, H. *et al.* Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin. Cancer Res.* 19, 5533–40 (2013).
85. Balko, J. M. *et al.* Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* 4, 232–45 (2014).
86. Guestini, F., McNamara, K. M., Ishida, T. & Sasano, H. Triple negative breast cancer chemosensitivity and chemoresistance: current advances in biomarkers identification. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 705–20 (2016).
87. Martín, M. *et al.* Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 123, 149–57 (2010).
88. Sparano, J. A. *et al.* Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1663–71 (2008).
89. Baselga, J. *et al.* Phase II Genomics Study of Ixabepilone as Neoadjuvant Treatment for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 526–534 (2009).
90. Pivot, X. B. *et al.* Activity of ixabepilone in oestrogen receptor-negative and oestrogen receptor-progesterone receptor-human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Eur. J. Cancer* 45, 2940–2946 (2009).
91. Liedtke, C. *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1275–81 (2008).
92. Yao, H. *et al.* Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? *Oncotarget* 8, 1913–1924 (2017).
93. Carey, L. A. *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* 13, 2329–34 (2007).
94. Gennari, A. *et al.* HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 14–20 (2008).

## 7. Bibliografia

---

95. Esserman, L. J. *et al.* Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J. Clin. Oncol.* 30, 3242–9 (2012).
96. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185–229 (2004).
97. Hastak, K., Alli, E. & Ford, J. M. Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin. *Cancer Res.* 70, 7970–80 (2010).
98. Silver, D. P. *et al.* Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1145–53 (2010).
99. von Minckwitz, G. *et al.* Abstract S2-04: Early survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto). *Cancer Res.* 76, S2-04-S2-04 (2016).
100. Denkert, C. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 33, 983–91 (2015).
101. Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A. & von Minckwitz, G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *Lancet (London, England)* 6736, 1–13 (2016).
102. Gradishar, W. J. *et al.* NCCN Guidelines Insights Breast Cancer, Version 1.2016. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 13, 1475–85 (2015).
103. Gu, G. *et al.* Targeting thyroid hormone receptor beta in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 150, 535–45 (2015).
104. Gu, G., Dustin, D. & Fuqua, S. A. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Current Opinion in Pharmacology* 31, 97–103 (2016).
105. Perou, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 15 Suppl 5, 39–48 (2010).
106. Lips, E. H. *et al.* Next generation sequencing of triple negative breast cancer to find predictors for chemotherapy response. *Breast Cancer Res.* 17, 134 (2015).

107. Geenen, J. J. J., Linn, S. C., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Pharmacokinet.* (2017). doi:10.1007/s40262-017-0587-4
108. Tutt, A. *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet (London, England)* 376, 235–44 (2010).
109. Gelmon, K. A. *et al.* Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet. Oncol.* 12, 852–61 (2011).
110. Foulkes, W. D. *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1482–5 (2003).
111. Budczies, J. *et al.* Classical pathology and mutational load of breast cancer - integration of two worlds. *J. Pathol. Clin. Res.* 1, 225–38 (2015).
112. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–58 (2013).
113. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 28, 690–714 (2015).
114. Dua, I. & Tan, A. R. Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: A Focus on Immune Checkpoint Inhibitors. *Am. J. Hematol. Oncol.* 13, 20–27 (2017).
115. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 23–34 (2015).
116. de Gramont, A. *et al.* Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 197–212 (2015).
117. Judes, G. *et al.* High-throughput «Omics» technologies: New tools for the study of triple-negative breast cancer. *Cancer Lett.* 382, 77–85 (2016).
118. Fleisher, B., Clarke, C. & Ait-Oudhia, S. Current advances in biomarkers for targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* 8, 183–197 (2016).

## 7. Bibliografia

---

119. Perez, E. A. Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 114, 195–201 (2009).
120. Clarke, R., Leonessa, F. & Trock, B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Semin. Oncol.* 32, S9-15 (2005).
121. Bouwman, P. & Jonkers, J. Molecular pathways: how can BRCA-mutated tumors become resistant to PARP inhibitors? *Clin. Cancer Res.* 20, 540–7 (2014).
122. Mark, H. F. *et al.* Study of chromosome 12 copy number in breast cancer using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 108, 26–31 (1999).
123. Fehm, T. *et al.* Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 75, 227–39 (2002).
124. Botti, C. *et al.* Incidence of chromosomes 1 and 17 aneusomy in breast cancer and adjacent tissue: an interphase cytogenetic study. *J. Am. Coll. Surg.* 190, 530–9 (2000).
125. Watters, A. D., Going, J. J., Cooke, T. G. & Bartlett, J. M. S. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 77, 109–14 (2003).
126. Climent, J. *et al.* Deletion of Chromosome 11q Predicts Response to Anthracycline-Based Chemotherapy in Early Breast Cancer. *Cancer Res.* 67, 818–826 (2007).
127. Reymond, A. *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–51 (2001).
128. Hatakeyama, S. TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 792–804 (2011).
129. Short, K. M. & Cox, T. C. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 281, 8970–80 (2006).
130. Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. & Morse, H. C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 849–60 (2008).
131. McNab, F. W., Rajsbaum, R., Stoye, J. P. & O’Garra, A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 46–56 (2011).

132. Meroni, G. & Diez-Roux, G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27, 1147–57 (2005).
133. Napolitano, L. M. & Meroni, G. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64, 64–71 (2012).
134. Hatakeyama, S. Early evidence for the role of TRIM29 in multiple cancer models. *Expert Opin. Ther. Targets* 8222, 14728222.2016.1148687 (2016).
135. Kapp, L. N. *et al.* Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 45–54 (1992).
136. Richard, C. W. *et al.* A radiation hybrid map of human chromosome 11q22-q23 containing the ataxia-telangiectasia disease locus. *Genomics* 17, 1–5 (1993).
137. Leonhardt, E. A., Kapp, L. N., Young, B. R. & Murnane, J. P. Nucleotide sequence analysis of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D (ATDC). *Genomics* 19, 130–6 (1994).
138. Hosoi, Y. & Kapp, L. N. Expression of a candidate ataxia-telangiectasia group D gene in cultured fibroblast cell lines and human tissues. *Int.J.Radiat.Biol* 66, S71–S76 (1994).
139. Carter, S. L. *et al.* Loss of Heterozygosity at 11q22-q23 in Breast Cancer. *Cancer Res.* 54, 6270–6274 (1994).
140. Murnane, J. P., Zhu, Y., Young, B. R. & Christman, M. F. Expression of the candidate A-T gene ATDC is not detectable in a human cell line with a normal response to ionizing radiation. *Int.J.Radiat.Biol* 66, S77–S84 (1994).
141. Hawthorn, L., Stein, L., Panzarella, J., Loewen, G. M. & Baumann, H. Characterization of cell-type specific profiles in tissues and isolated cells from squamous cell carcinomas of the lung. *Lung Cancer* 53, 129–42 (2006).
142. Dyrskjøt, L. *et al.* Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res.* 64, 4040–8 (2004).
143. Glebov, O. K. *et al.* Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 2253–62 (2006).

## 7. Bibliografia

---

144. Santin, A. D. *et al.* Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. cancer* 112, 14–25 (2004).
145. Mutter, G. L. *et al.* Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol. Oncol.* 83, 177–85 (2001).
146. Zhan, F. *et al.* Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99, 1745–57 (2002).
147. Yuan, Z. *et al.* The ATDC (TRIM29) Protein Binds p53 and Antagonizes p53-Mediated Functions. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3004–3015 (2010).
148. Yuan, Z., Peng, L., Radhakrishnan, R. & Seto, E. Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein. *J. Biol. Chem.* 285, 39329–38 (2010).
149. Sho, T. *et al.* TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 1245–1253 (2011).
150. Wang, L. *et al.* ATDC induces an invasive switch in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Genes Dev.* 29, 171–183 (2015).
151. Wang, L. *et al.* Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization. *Cancer Cell* 15, 207–19 (2009).
152. Wang, L. *et al.* ATDC/TRIM29 phosphorylation by ATM/MAPKAP kinase 2 mediates radioresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 74, 1778–88 (2014).
153. Kosaka, Y. *et al.* Tripartite motif-containing 29 (TRIM29) is a novel marker for lymph node metastasis in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 14, 2543–9 (2007).
154. Tang, Z. P. *et al.* Ataxia-Telangiectasia Group D Complementing Gene (ATDC) Promotes Lung Cancer Cell Proliferation by Activating NF- $\kappa$ B Pathway. *PLoS One* 8, (2013).
155. Xiao, Z. *et al.* The pivotal role of IKK $\alpha$  in the development of spontaneous lung squamous cell carcinomas. *Cancer Cell* 23, 527–40 (2013).
156. Palmbo, P. L. *et al.* ATDC/TRIM29 Drives Invasive Bladder Cancer Formation through miRNA-Mediated and Epigenetic Mechanisms. *Cancer Res.* 75, 5155–5166 (2015).

157. Tan, S.-T., Liu, S.-Y. & Wu, B. TRIM29 Overexpression Promotes Proliferation and Survival of Bladder Cancer Cells through NF- $\kappa$ B Signaling. *Cancer Res. Treat.* 48, 1302–1312 (2016).
158. Xu, J., Li, Z., Su, Q., Zhao, J. & Ma, J. TRIM29 promotes progression of thyroid carcinoma via activating P13K/AKT signaling pathway. *Oncol. Rep.* 1555–1564 (2017). doi:10.3892/or.2017.5364
159. Zhou, X.-M. *et al.* Upregulated TRIM29 promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PTEN/AKT/mTOR signal pathway. *Oncotarget* 1, (2016).
160. Xu, R., Hu, J., Zhang, T., Jiang, C. & Wang, H. TRIM29 overexpression is associated with poor prognosis and promotes tumor progression by activating wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cervical cancer. *Oncotarget* 7, 28579–28591 (2016).
161. Xu, W. *et al.* RNA interference against TRIM29 inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* 36, 1411–8 (2016).
162. Guo, G., Wang, J., Han, M., Zhang, L. & Li, L. microRNA-761 induces aggressive phenotypes in triple-negative breast cancer cells by repressing TRIM29 expression. *Cell. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s13402-016-0312-6
163. Ai, L. *et al.* TRIM29 Suppresses TWIST1 and Invasive Breast Cancer Behavior. *Cancer Res.* 74, 4875–4887 (2014).
164. Liu, J., Welm, B., Boucher, K. M., Ebbert, M. T. W. & Bernard, P. S. TRIM29 Functions as a Tumor Suppressor in Nontumorigenic Breast Cells and Invasive ER+ Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 180, 839–847 (2012).
165. Kanno, Y. *et al.* TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta Histochem.* 116, 708–12 (2014).
166. Avraham, A. *et al.* Tissue Specific DNA Methylation in Normal Human Breast Epithelium and in Breast Cancer. *PLoS One* 9, e91805 (2014).
167. Neve, R. M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527 (2006).
168. Yau, C. *et al.* Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers. *Breast Cancer Res.* 9, R59 (2007).
169. Chin, K. *et al.* Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell* 10, 529–41 (2006).

## 7. Bibliografia

---

170. D'haene, B., Vandesompele, J. & Hellemans, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* 50, 262–270 (2010).
171. Lu, Y. J. *et al.* Disruption of the ATM gene in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 126, 97–101 (2001).
172. Sherif, Z. A. & Danielsen, M. Balanced t(11;15)(q23;q15) in a TP53+/+ breast cancer patient from a Li-Fraumeni syndrome family. *Cancer Genet. Cytogenet.* 168, 50–58 (2006).
173. Campbell, E. J. *et al.* The combined endocrine receptor in breast cancer, a novel approach to traditional hormone receptor interpretation and a better discriminator of outcome than ER and PR alone. *Br. J. Cancer* 115, 967–973 (2016).
174. Bernemann, C. *et al.* Influence of secreted frizzled receptor protein 1 (SFRP1) on neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer does not rely on WNT signaling. *Mol. Cancer* 13, 174 (2014).
175. Desmedt, C. *et al.* Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin. Cancer Res.* 13, 3207–14 (2007).
176. Wang, Y. *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet (London, England)* 365, 671–9
177. Sabatier, R. *et al.* A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 126, 407–20 (2011).
178. Masuda, Y. *et al.* TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nat. Commun.* 6, 7299 (2015).
179. Tang, Z.-P. *et al.* Ataxia-Telangiectasia Group D Complementing Gene (ATDC) Promotes Lung Cancer Cell Proliferation by Activating NF- $\kappa$ B Pathway. *PLoS One* 8, e63676 (2013).
180. Zhou, Z.-Y., Yang, G.-Y., Zhou, J. & Yu, M.-H. Significance of TRIM29 and  $\beta$ -catenin expression in non-small-cell lung cancer. *J. Chinese Med. Assoc.* 75, 269–274 (2012).
181. Song, X. *et al.* Tripartite motif-containing 29 as a novel biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 10, 2283–2288 (2015).
182. Lai, W., Zheng, X., Huang, Q., Wu, X. & Yang, M. Down-regulating ATDC inhibits the proliferation of esophageal carcinoma cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18, 3511–6 (2014).

183. Zeng, S.-X. *et al.* High expression of TRIM29 (ATDC) contributes to poor prognosis and tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma. *Oncol. Rep.* 38, 1645–1654 (2017).
184. Qiu, F., Xiong, J.-P., Deng, J. & Xiang, X.-J. TRIM29 functions as an oncogene in gastric cancer and is regulated by miR-185. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 5053–61 (2015).
185. Zhou, X.-M. *et al.* Upregulated TRIM29 promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PTEN/AKT/mTOR signal pathway. *Oncotarget* 7, 13634–50 (2016).
186. Inaki, K. *et al.* Transcriptional consequences of genomic structural aberrations in breast cancer. *Genome Res.* 21, 676–687 (2011).
187. Shaver, T. M. *et al.* Diverse, Biologically Relevant, and Targetable Gene Rearrangements in Triple-Negative Breast Cancer and Other Malignancies. *Cancer Res.* 76, 4850–4860 (2016).
188. Hayette, S. *et al.* AF15q14, a novel partner gene fused to the MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). *Oncogene* 19, 4446–50 (2000).
189. Cinkaya, A., Akin, M. & Sengul, A. Evaluation of treatment outcomes of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Ther.* 12, 150–4 (2016).
190. Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J. Cancer* 7, 1281–1294 (2016).
191. Basho, R. K. *et al.* Clinical outcomes based on multigene profiling in metastatic breast cancer patients. *Oncotarget* 7, 76362–76373 (2016).
192. Kumar, P. & Aggarwal, R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 293, 247–269 (2016).
193. Hiraguri, S. *et al.* Mechanisms of Inactivation of E-Cadherin in Breast Cancer Cell Lines Mechanisms of Inactivation of E-Cadherin in Breast Cancer Cell Lines1. 1, 1972–1977 (1998).
194. Ma, F. *et al.* MiR-23a promotes TGF- $\beta$ 1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt /  $\beta$ -catenin signaling. 8, 1–13 (2017).
195. Liu, J.-B. *et al.* E-cadherin expression phenotypes associated with molecular subtypes in invasive non-lobular breast cancer: evidence from a retrospective study and meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* 15, 139 (2017).

## 7. Bibliografia

---

196. Bruner, H. C. & Derksen, P. W. B. Adhesion and the Development and Progression of Cancer. 2, (2017).
197. Paredes, J. *et al.* P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res.* 9, 214 (2007).
198. Vieira, A. F. & Paredes, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol. Cancer* 14, 178 (2015).
199. Clausen, K. a. *et al.* SOSTDC1 differentially modulates Smad and beta-catenin activation and is down-regulated in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 129, 737–746 (2011).
200. Zhou, Q. *et al.* SOSTDC1 inhibits follicular thyroid cancer cell proliferation, migration, and EMT via suppressing PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 435, 87–95 (2017).
201. Finch, P. W. *et al.* Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6770–6775 (1997).
202. Ba, S., Xuan, Y., Long, Z.-W., Chen, H.-Y. & Zheng, S.-S. MicroRNA-27a Promotes the Proliferation and Invasiveness of Colon Cancer Cells by Targeting SFRP1 through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 1920–1933 (2017). doi:10.1159/000479610
203. Qiao, B., He, B.-X., Cai, J.-H., Tao, Q. & King-yin Lam, A. MicroRNA-27a-3p Modulates the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Carcinoma Stem Cells by Targeting SFRP1. *Sci. Rep.* 7, 44688 (2017).
204. Barták, B. K. *et al.* Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics* 2294, 1–13 (2017).
205. Yang, X. *et al.* Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) gene methylation changes in the human lung adenocarcinoma cells treated with L-securinine. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 6020, 1–9 (2017).
206. Li, H., Yang, T., Shang, D. & Sun, Z. miR-1254 promotes lung cancer cell proliferation by targeting SFRP1. *Biomed. Pharmacother.* 92, 913–918 (2017).
207. Shang, A. *et al.* MiR-1-3p Suppresses the Proliferation, Invasion and Migration of Bladder Cancer Cells by Up-Regulating SFRP1 Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* 41, 1179–1188 (2017).

208. Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768 (2008).
209. Hermann, P. C. *et al.* Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313–323 (2007).
210. Khaled, W. T. *et al.* BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. *Nat. Commun.* 6, 1–10 (2015).
211. Zhang, N. *et al.* The BCL11A-XL expression predicts relapse in squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. *J. Thorac. Dis.* 7, 1630–1636 (2015).
212. Tao, H. *et al.* BCL11A expression in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 41, 71–75 (2016).
213. Yin, J. *et al.* BCL11A expression in acute phase chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 47, 88–92 (2016).
214. Symmans, W. F. *et al.* A single-gene biomarker identifies breast cancers associated with immature cell type and short duration of prior breastfeeding. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 1059–69 (2005).
215. Zafrakas, M. *et al.* Systematic characterisation of GABRP expression in sporadic breast cancer and normal breast tissue. *Int. J. Cancer* 118, 1453–1459 (2006).
216. Sung, H. Y., Yang, S.-D., Ju, W. & Ahn, J.-H. Aberrant epigenetic regulation of GABRP associates with aggressive phenotype of ovarian cancer. *Exp. Mol. Med.* 49, e335 (2017).
217. Hosoi, Y. *et al.* Suppression of anchorage-independent growth by expression of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 728–734 (2006).
218. Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J. & Pietenpol, J. A. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer* 121, 8–16 (2015).
219. Yang, H. *et al.* ATDC (Ataxia Telangiectasia Group D Complementing) Promotes Radioresistance through an Interaction with the RNF8 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* 290, 27146–27157 (2015).
220. Dükel, M. *et al.* The Breast Cancer Tumor Suppressor TRIM29 Is Expressed via ATM-dependent Signaling in Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 291, 21541–21552 (2016).



## **8. *Anexos***



<b>Especificidad del anticuerpo</b>	<b>Compañía Anticuerpo Western Blot</b>	<b>Dilución Western Blot</b>
<b>TRIM29</b>	Santa Cruz (sc-33151)	1:1000
<b>E-Cadherina</b>	Abcam (133597)	1:1000
<b>P-Cadherina</b>	Santa Cruz (sc-7893)	1:1000
<b>SFRP1</b>	Abcam (ab4193)	1:1000
<b>Bcl11a</b>	Abcam (ab191402)	1:10000
<b>Gabrp</b>	Abcam (ab26055)	1:2000
<b>Sostdc1</b>	Abcam (ab99340)	1:1000
<b>Prom1 (CD133)</b>	ThermoFisher Scientific (PA5-38014)	1:200
<b>Gapdh</b>	Abcam (ab8245)	1:10000
<b>H2AX</b>	Abcam (ab2893)	1:1000
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	Abcam (ab11175)	1:1000

**Anexo 1. Anticuerpos utilizados en Western Blot para observar el nivel de proteína de TRIM29 y de los genes correlacionados positivamente, en líneas celulares de cáncer de mama.**

<b>Especificidad del anticuerpo</b>	<b>Compañía Anticuerpo</b>	<b>IHQ</b>	<b>Dilución Inmunohistoquímica</b>
<b>TRIM29</b>	Novus Biologicals (NB120-22207)		1:100
<b>E-Cadherina</b>	Dako A/S (M3612)		Pre-diluido
<b>P-Cadherina</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7893)		1:100
<b>SFRP1</b>	Abcam (ab4193)		1:800
<b>Bcl 11a</b>	Abcam (ab191402)		1:75
<b>Gabrrp</b>	Abcam (ab26055)		1: 100
<b>Prom1 (CD133)</b>	ThermoFisher Scientific (PA5-38014)		1:200
<b>EGFR</b>	Dako A/S (M7298)		1:50
<b>TP53</b>	Sigma-Aldrich (P5813)		1:400
<b>Vimentina</b>	Dako A/S (M7020)		1:100/1:200

**Anexo 2. Anticuerpos utilizados en tinciones inmunohistoquímicas para observar el nivel de proteína de TRIM29 y los genes positivamente correlacionados, en líneas celulares de cáncer de mama.**

Especificidad del anticuerpo	Clona	Compañía	Dilución	Desenmascaramiento Antigénico	Kit de detección
<b>TRIM29</b> : policlonal rabbit anti-TRIM29	Policlonal Rabbit	Novus Biologicals (NB120-22207)	1:100	Calor húmedo (autoclave) + Citrato buffer pH 6.0	Dako EnVision™ + Dual Link System- HRP (DAB+)
<b>ER</b> : Estrogen Receptor (ER) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM	SP1 Rabbit	Ventana Roche (790-4324)	Pre-diluido	Ventana Wash Solution	ultraView Universal DAB Detection Kit
<b>PR</b> : Progesterone Receptor (PR) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM	IE2 Rabbit	Ventana Roche (790-2223)	Pre-diluido	Ventana Wash Solution	ultraView Universal DAB Detection Kit
<b>HER2</b> : HER-2/neu Rabbit Monoclonal Primary Antibody, PATHWAY	4B5 Rabbit	Ventana Roche (790-2991)	Pre-diluido	Ventana Wash Solution	ultraView Universal DAB Detection Kit
<b>Ki67</b> : Ki-67 Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM	30-9 Rabbit	Ventana Roche (790-4286)	Pre-diluido	Ventana Wash Solution	ultraView Universal DAB Detection Kit

**Anexo 3. Marcadores utilizados en los TMAs para clasificar los tumores según los receptores de Estrógenos, Progesterona y HER2, y según su nivel proliferativo mediante la expresión de Ki-67, así como el anticuerpo utilizado para observar la expresión de TRIM29.**

## 8. Anexos

Línea Celular	Subtipo	ER	PR	HER2	TP53	Tipo Tumoral	Edad (Años)	Etnia	Medio de Cultivo	Condiciones
AU565	Lu	-	-	+	+ Wt	AC	43	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
BT474	Lu	+	+	+	+	IDC	60	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
BT483	Lu	+	+		-	IDC, pap	23	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
CAMA.1	Lu	+	-		+	AC	51	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
DU4475	Lu						70	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC202	Lu	-	-	+	-	Duc.Ca	82	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1428	Lu	+	+		+	AC	49	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1007	Lu	+	-		+/-	Duc.Ca	67	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC2185	Lu	-	-		+	MLCa	49	Ca Hisp	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
LY2	Lu	+	-		+/-	IDC	69	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
X600MPE	Lu	+	-		-	IDC			DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MCf7	Lu	+	+		+/-	IDC	69	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB415	Lu	+	-		+	AC	38	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB175	Lu	+	-		+/- Wt	IDC	56	Neg	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB361	Lu	+	-	+	-Wt	P.Br	40	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB134	Lu	+	-		+/- Wt	IDC	47	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM.185PE	Lu	-	-		-	Duc.Ca			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM225	Lu	-	-	+	++	IDC			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM.44PE	Lu	+	-		-	Ca			Ham's F12, SF IH**	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SKBR3	Lu	-	-	+	+	AC	43	Cau	McCoy's 5A, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
T47D	Lu	+	+		++ M	IDC			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
UACC812	Lu	+	-	+	- Wt	IDC	43		DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
ZR.75.B	Lu	+	-		+/-				RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
ZR75.1	Lu	+	-		-	IDC	63	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
ZR75.30	Lu	+	-	+	- Wt	IDC	47	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDAMB 453	Lu	-	-		- Wt	AC	48	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM52 PE	Lu	+	-		-	Ca			Ham's F12, SF IH***	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
UACC893	Lu	-	-	+			57	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
BT20	Bas	-	-		++ Wt	IDC	74	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1937	Bas	-	-		-	Duc.Ca	24	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC70	Bas	-	-		++ M	Duc.Ca	49	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1187	Bas	-	-		++ M	Duc.Ca	41	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1008	Bas	-	-	+	+		67	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1599	Bas	-	-		-		44	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC3153	Bas	-	-		-				RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1569	Bas	-	-	+	-M	MC	70	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC2157	Bas	-	-		+	Duc.Ca	48	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1954	Bas	-	-	+	+/-	Duc.Ca	61	Ind Este	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC.38	Bas	-	-		++ M	Duc.Ca	50	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1806	Bas	-	-		-		60	Neg	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HCC1143	Bas	-	-		++ M	Duc.Ca	52	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MCF.12A	Bas	-	-		+	F	60	Cau	DMEM F12*	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MCF10A	Bas	-	-		+/- Wt	F	36	Cau	DMEM F12*	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDAMB.468	Bas	-	-		+	AC	51	Neg	L15, 10% FBS	37°C, no CO <sub>2</sub>
SUM.149PT	Bas	-	-		+	Inf. Duc. Ca			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM.190PT	Bas	-	-	+	+/-	Inf			Ham's F12, SF IH**	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
BT549	Mes	-	-		++ M	IDC, pap	72	Cau	RPMI, 10%FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HS578T	Mes	-	-		+ M	IDC	74	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HBL100	Mes	-	-		++	N	27		DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDAMB.231	Mes	-	-		++ M	AC	51	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB435	Mes	-	-		+ M	IDC	31	Cau	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB157	Mes	-	-		-	MC	44	Neg	DMEM, 10% FBS	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
MDA.MB436	Mes	-	-		-	IDC	43	Cau	L15, 10% FBS	37°C, no CO <sub>2</sub>
SUM.159PT	Mes	-	-		-	An Car			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
SUM.1315	Mes	-	-		+	IDC			Ham's F12, 5% IH	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
184A1	Normal						21		MEBM Trans - TxC	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
184B5	Normal						21		MEBM TxC	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HMLE	Normal								MEBM SF	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
HMLE-PR	Normal								MEBM SF	37°C, 5% CO <sub>2</sub>

Anexo 4. Tabla resumen de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo donde se resumen características como el subtipo, el estado de los receptores de Estrógenos, Progesterona, HER2, y el estado mutacional de genes como TP53, el tipo tumoral, la procedencia de la línea tumoral según la etnia y la edad de la paciente a partir de la cual se estableció de manera estable la línea celular. Las abreviaturas presentes en la tabla anterior se detallan a continuación: AC, adenocarcinoma; AnCar, carcinoma anaplásico; Bas, Basal; Ca, Carcinoma; Cau, caucásico; F, enfermedad fibrocística; Hisp, hispánico; IDC, carcinoma ductal invasivo; Inf, inflamatorio; Lu, luminal; M, proteína mutante; MC, carcinoma Metaplástico; Mes, Mesenquimal; MLCa, carcinoma lobular Metaplástico; N, normal; Pap, papilar; Neg, Negra; WT, proteína wild-type. También se indican las condiciones de cultivo más adecuadas para el crecimiento de las líneas celulares: FBS, suero bovino fetal; I, Insulina (0.01 mg/ml); H, hidrocortisona (500 ng/ml); E, EGF (20 ng/ml); Trans, Transferrina (0.005 mg/ml); TxC, Toxina Colérica (1 ng/ml); DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; RPMI, RPMI medium 1640; Ham's F12, F-12 nutrient mixture (Ham); DMEM/F12, Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient mix F-12 (D-MEM/F-12; L15, Leibovitz's L-15 medium. \*Para las líneas celulares MCF10A y MCF12A, se requería el suplemento de DMEM/F12 media con 5% suero de caballo, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml toxina colérica, 0.01mg/ml insulina, y 500 ng/ml hidrocortisona. \*\*Para medios libres de suero (SF), suplementar Ham's F12 con 0.5 mg/ml seroalbúmina bovina, 5mM Methanolamina, 10mM HEPES, 5 mg/ml transferrina, 10 mM MT3, 50 mM Se, 5 mg/ml insulina, 1 mg/ml hidrocortisona. \*\*\*Para medios de cultivo F12, suplementar con 5% FBS, 5 mg/ml insulina, y 1 mg/ml hidrocortisona o 10 ng/ml EGF. Las líneas celulares aAU565 y SKBR3 derivaban del mismo

## 8. Anexos

Línea Celular	Subtipo	Copy Number Variation		FISH		Metilación		Expresión	
		aCGH	q-RT-PCR	ESTADO	Alteración Cromosómica	Promotor-ESTADO	Pre-promotor-ESTADO	mARN	Proteína
AU565	Lum	Normal	Normal	Normal		Hipometilado	Hipometilado	Expresado	No
BT474	Lum	Normal	Delección			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
BT483	Lum	Delección				Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
CAMA.1	Lum	Delección				Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
DU4475	Lum	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	
HCC202	Lum	Delección				Hipometilado	Metilado	Expresado	
HCC1428	Lum	Normal	Normal			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
HCC1007	Lum	Delección				Hipometilado	Metilado	Expresado	
HCC2185	Lum	Ganancia	Normal	Normal		Metilado	Metilado	Expresado	
LY2	Lum	Delección	Delección	Delección		Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
X600MPE	Lum	Delección	Delección			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	No
MCF7	Lum	Delección	Delección	Delección		Metilado	Metilado	Infraexpresado	No
MDA.MB415	Lum	Delección	Delección			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	
MDA.MB175	Lum	Delección	Delección			Metilado	Metilado	Infraexpresado	
MDA.MB361	Lum	Delección	Delección			Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
MDA.MB134	Lum	Delección	Normal			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
SUM.185PE	Lum	Normal				Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
SUM225	Lum	Delección	Normal			Metilado	Metilado	Expresado	
SUM.44PE	Lum	Delección				Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
SKBR3	Lum	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	No
T47D	Lum	Normal	Ganancia	Normal		Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
UACC812	Lum	Normal				Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	
ZR.75.B	Lum	Delección	Delección			Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
ZR75.1	Lum	Delección	Normal	Normal	Translocación	Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	
ZR75.30	Lum	Delección	Delección			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	
MDAMB 453	Lum	Delección	Delección			Hipometilado	Metilado	Expresado	No
SUM52 PE	Lum	Delección	Normal			Hipometilado	Metilado	Expresado	
UACC893	Lum	Delección	Delección			Hipometilado	Metilado	Expresado	
BT20	Bas	Ganancia	Ganancia	Ganancia		Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	
HCC1937	Bas	Ganancia	Ganancia	Normal	Translocación	Hipometilado	Metilado	Sobreexpresado	Si
HCC70	Bas	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	
HCC1187	Bas	Ganancia	Ganancia			Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	
HCC1008	Bas	Normal				Hipometilado	Metilado	Expresado	
HCC1599	Bas	Normal				Hipometilado	Metilado	Expresado	
HCC3153	Bas	Normal	Normal	Normal	Translocación	Hipometilado	Hipometilado	Sobreexpresado	Si
HCC1569	Bas	Ganancia	Ganancia	Ganancia		Metilado	Hipometilado	Expresado	No
HCC2157	Bas	Normal				Hipometilado	Metilado	Expresado	
HCC1954	Bas	Delección	Delección	Delección		Metilado	Metilado	Expresado	No
HCC.38	Bas	Delección	Delección	Delección		Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	No
HCC1806	Bas	Ganancia	Ganancia	Normal	Translocación	Hipometilado	Hipometilado	Sobreexpresado	Si
HCC1143	Bas	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Sobreexpresado	No
MCF.12A	Bas	Normal	Ganancia			Hipometilado	Hipometilado	Sobreexpresado	Si
MCF10A	Bas	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	Si
MDAMB 468	Bas	Ganancia	Normal			Metilado	Metilado	Expresado	
SUM.149PT	Bas	Normal	Ganancia			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	No
SUM.190PT	Bas	Delección				Hipometilado	Metilado	Expresado	
BT549	Mes	Normal	Ganancia	Normal		Metilado	Metilado	Infraexpresado	No
HSS78T	Mes	Delección	Normal			Hipometilado	Metilado	Infraexpresado	No
HLB100	Mes	Delección	Delección	Delección		Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
MDAMB.231	Mes	Normal	Normal	Normal		Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
MDA.MB435	Mes	Normal	Ganancia			Metilado	Metilado	Infraexpresado	No
MDA.MB157	Mes	Delección	Normal			Metilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
MDA.MB436	Mes	Delección	Delección	Delección		Metilado	Metilado	Infraexpresado	No
SUM.159PT	Mes	Normal	Normal			Hipometilado	Hipometilado	Infraexpresado	No
SUM.1315	Mes	Delección	Delección			Metilado	Metilado	Infraexpresado	No
184A1	Normal		Ganancia			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	
184B5	Normal		Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	
HMLE	Normal		Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	
HMLE-PR	Normal		Normal			Hipometilado	Hipometilado	Expresado	

**Anexo 5. Caracterización de TRIM29 a nivel de ADN (Copy Number Variation, FISH y Metilación), ARN (Expresión) y proteína (Expresión) en 59 líneas celulares de cáncer de mama de diferentes subtipos (Lum=Luminal, Bas=Basal, Mes=Mesenquimal) y líneas celulares consideradas como normales.**

Tejido	P-valor	P-valor Ajustado	Z-score	Calificación Combinada	Genes
GASTRIC EPITHELIAL CELL	5,4507E-05	0,00147168	-1,70056726	16,6947929	GABRP;CDH3;TRIM29;CDH1;SOSTDC1;PROM1
SKIN (BULK TISSUE)	5,4507E-05	0,00147168	-1,63475686	16,0487197	GABRP;SFRP1;CDH3;TRIM29;CDH1;SOSTDC1
BREAST (BULK TISSUE)	5,4507E-05	0,00147168	-1,56938583	15,4089232	GABRP;SFRP1;CDH3;TRIM29;CDH1;SOSTDC1
ESOPHAGUS (BULK TISSUE)	0,00085811	0,01390134	-1,63485605	11,5433612	GABRP;CDH3;TRIM29;CDH1;SOSTDC1
HUMANEMBRYO	0,00085811	0,01390134	-1,47064486	10,3839019	GABRP;SFRP1;CDH3;CDH1;PROM1
TRACHEA (BULK TISSUE)	0,00854002	0,04941012	-1,7914938	8,53287052	SFRP1;CDH3;TRIM29;CDH1
OVARY (BULK TISSUE)	0,00854002	0,04941012	-1,52924243	7,28376937	GABRP;SFRP1;CDH3;SOSTDC1
RENAL CORTEX	0,00854002	0,04941012	-1,4976391	7,13324297	SFRP1;CDH3;CDH1;SOSTDC1
BASAL CELL	0,00854002	0,04941012	-1,40396574	6,68707749	GABRP;CDH3;TRIM29;CDH1

**Anexo 6. Resultado del análisis de enriquecimiento mediante la herramienta online Enrichr en la base de datos ARCHS4 Tissue, mediante la cual se ha visto que los genes positivamente correlacionados con TRIM29, están relacionados de manera significativa con células epiteliales gástricas, con piel y mama.**

Enfermedad	P-valor	P-valor Ajustado	Z-score	Calificación Combinada	Genes
breast cancer:DOID-1612 human GSE3744 sample 978	3,0799E-09	3,4554E-07	-1,60034285	31,3641117	GABRP;SFRP1;CDH3;TRIM29;SOSTDC1;PROM1
Breast Cancer C0006142 human GSE3744 sample 24	3,3386E-09	3,4554E-07	-1,60396981	31,3058326	GABRP;SFRP1;CDH3;TRIM29;SOSTDC1;PROM1
invasive lobular carcinoma:DOID-3457 human GSE5764 sample 625	3,9204E-06	0,00027051	-1,72343944	21,4356238	GABRP;SFRP1;CDH1;PROM1
idiopathic urticaria:DOID-1355 human GSE5718 sample 815	4,7078E-05	0,00243628	-1,7332187	17,2892088	GABRP;SFRP1;SOSTDC1
breast cancer:DOID-1612 human GSE9574 sample 448	0,00011069	0,00447102	-1,70629882	15,5423336	GABRP;SOSTDC1;PROM1
Endometriosis C0014175 human GSE7305 sample 149	0,00012959	0,00447102	-1,72480065	15,4388609	GABRP;SFRP1;PROM1
breast adenocarcinoma:DOID-3458 human GSE61304 sample 1071	0,00024289	0,00457075	-1,84776823	15,3787942	GABRP;SOSTDC1;PROM1
Strogren's syndrome:DOID-12894 human GSE23117 sample 889	0,00019126	0,00457075	-1,67120994	14,3086809	CDH1;TRIM29;PROM1
Breast Cancer C0006142 human GSE2429 sample 148	0,00022208	0,00457075	-1,68335256	14,1611714	SFRP1;CDH3;CDH1
Lung transplant rejection C0729958 mouse GSE3418 sample 83	0,00018943	0,00457075	-1,65201219	14,1601697	GABRP;CDH1;PROM1

**Anexo 7. Resultado del análisis de enriquecimiento mediante la herramienta online EnrichR en la base de datos Disease Perturbations GEO DOWN, en la cual se ha visto que el cáncer de mama es la enfermedad significativamente relacionada con los genes correlacionados con TRIM29 cuando estos presentan una expresión baja, indicando un marcado carácter oncoprotector.**

Proceso Biológico	P-valor	P-valor Ajustado	Z-score	Calificación Combinada	Genes
positive regulation of transcription, DNA-templated	0,005383996	0,04363131	-7,0049058	36,0264553	SFRP1,CDH3,CDH1
adherens junction maintenance	7,3467E-05	0,00791165	-2,79678598	26,6217094	CDH3,CDH1
adherens junction organization	0,00013742	0,00791165	-2,75960814	24,5397394	CDH3,CDH1
positive regulation of keratinocyte proliferation	0,00011959	0,00791165	-2,68558299	24,2367327	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway involved in positive regulation of cell-cell adhesion	0,00023684	0,00808026	-2,81279706	23,4816417	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway involved in mesenchymal stem cell differentiation	0,00017677	0,00791165	-2,70788795	23,3979847	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway involved in negative regulation of apoptotic process	0,00892414	0,04363131	-4,82374746	22,7726817	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway involved in positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	0,00046878	0,0143102	-2,96686736	22,7421421	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway involved in positive regulation of wound healing	0,00023757	0,00926602	-2,78260134	22,6894917	SFRP1,CDH3
beta-catenin destruction complex disassembly	0,000223885	0,00808026	-2,68711694	22,5245761	SFRP1,CDH3
adherens junction assembly	0,00017677	0,00791165	-2,58554958	22,3408984	CDH3,CDH1
canonical Wnt signaling pathway involved in positive regulation of apoptotic process	0,00513645	0,04299533	-4,19146879	22,0948773	SFRP1,CDH3
canonical Wnt signaling pathway	0,00063959	0,01686203	-2,92435651	21,5076956	SFRP1,CDH3
receptor internalization involved in canonical Wnt signaling pathway	0,00051493	0,014933	-2,80383318	21,2443027	SFRP1,CDH3
negative regulation of cell-cell adhesion by transcription from RNA polymerase II promoter	0,00474919	0,0421007	-3,94176394	21,0875782	CDH1,TRIM29
canonical Wnt signaling pathway involved in positive regulation of endothelial cell migration	0,0006008	0,01659366	-2,80160833	20,7802025	SFRP1,CDH3
positive regulation of transcription from RNA polymerase III promoter	0,01491501	0,04363131	-4,83043354	20,3138445	SFRP1,CDH1

**Anexo 8. Resultado del análisis de enriquecimiento mediante la herramienta online EnrichR en la base de datos GO Biological Process 2017b, en la que se ha visto que estos genes están relacionados con procesos basados en la regulación de la transcripción el ADN, adhesión celular y múltiples rutas relacionadas con la vía de señalización Wnt.**

Localización molecular	P-valor	P-valor Ajustado	Z-score	Calificación Combinada	Genes
BCL2_complex	0.00049502	0.03035467	-8.27045677	62.9456879	SFRP1;CDH1;BCL11A;PRONM1
Bcl2_family_protein_complex	0.00082327	0.03062577	-8.45216464	60.0291526	SFRP1;CDH1;BCL11A;PRONM1
BAX_complex	0.00200228	0.0413805	-5.445842708	33.9157594	SFRP1;CDH1;PRONM1
VEGF-A_complex	0.00161201	0.03815992	-5.2698123	33.8863233	CDH1;BCL11A;PRONM1
Apical_complex	0.01236384	0.09198695	-6.81848402	29.9534598	CDH1;SOSTDC1;PRONM1
Survivin_complex	0.00050651	0.03035467	-3.72097987	28.2346425	SFRP1;CDH1;PRONM1
Intrinsic_component_of_membrane	0.03505168	0.12271451	-8.38103502	28.0842753	GABRP;SFRP1;CDH3;CDH1;PRONM1
Integral_component_of_membrane	0.03165118	0.12271451	-8.09773675	27.9613219	GABRP;SFRP1;CDH3;CDH1;PRONM1
Spanning_component_of_plasma_membrane	0.01672553	0.10727408	-6.69006385	27.3678408	GABRP;CDH3;CDH1;PRONM1
Plasma_membrane_region	0.00446785	0.06369202	-4.99420071	27.0228611	GABRP;CDH1;PRONM1
cell-cell_adherens_junction	0.00022208	0.03035467	-3.16827461	26.6530498	CDH3;CDH1;TRIM29
cell-cell_junction	0.00153528	0.03815992	-3.89303987	25.282526	CDH3;CDH1;TRIM29
Extracellular_erosome_complex	0.02713325	0.12271451	-6.2664918	22.6032062	CDH1;PRONM1
Extracellular_space	0.01323377	0.09467235	-4.66028907	20.1556732	SFRP1;SOSTDC1;PRONM1
PTEN_phosphatase_complex	0.00513645	0.06369202	-3.73564281	19.6920397	CDH1;PRONM1
Extracellular_region_part	0.04613557	0.12271451	-6.56556568	19.5815629	SFRP1;CDH1;SOSTDC1;PRONM1
Phosphatidylinositol_phosphate_phosphatase_complex	0.0066237	0.06484789	-3.62926956	18.2084149	CDH1;PRONM1
Integrin_alpha2_beta1_complex	0.00065279	0.03035467	-2.20384404	16.1635592	CDH1;PRONM1
lanthan_5_complex	0.00164129	0.03815992	-2.23496064	14.3111817	CDH3;CDH1
DNA_polymerase_processivity_factor_complex	0.03681012	0.12271451	-4.3356955	14.3163905	CDH1;PRONM1
Cell_junction	0.00732694	0.06484789	-2.46297963	12.1084942	CDH3;CDH1

**Anexo 9. Resultado del análisis de enriquecimiento mediante la herramienta online EnrichR en la base de datos JENSEN Compartments, en la que se vio que los elementos identificados con una correlación positiva con TRIM29 estaban relacionados con los complejos de apoptosis y adhesión celular.**