

Análisis de la Expresión de los Genes *INCENP* y *PLK1* en las Líneas Celulares NIH-3T3 y HT-29 y su Asociación con el Proceso de Inestabilidad Genómica

Daniela Gallego-Serna ^{1*} & Mauricio Alberto Quimbaya Gómez, PhD ^{2,3}

¹ Programa de Biología, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia

² ¡OMICAS: Optimización Multiescala In-silico de Cultivos Agrícolas Sostenibles, Colombia

³ Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia

*Correspondencia:

e-mail: dgallego@javerianacali.edu.co

ABSTRACT

A fundamental characteristic of cancer is genomic instability (GI), in which the genome, by accumulating mutations without being detected or repaired, undergoes permanent changes in the DNA sequence. There are trigger genes for GI among which *PLK1* has been reported, which is a master regulator of the chromosome segregation process, specifically at the G2/M checkpoint and cytokinesis. *PLK1*-mediated phosphorylation facilitates the correct docking of the chromatic spindle at the right time and place of mitotic division. Overexpression of this gene can lead to the formation of binucleated cells, chromosomal instability (CIN) and aneuploidy, which may contribute to the development of cancer. Likewise, the *INCENP* gene participates in the process of sister chromatid segregation and although there are few studies in which the role of *INCENP* as an inducer of GI is reported, it is believed that it could be involved, due to its participation in the Chromosome Passenger Complex (CPC). The research work explored the transcriptional relationship between *INCENP* and *PLK1* genes, evaluating the expression of both molecules in two contrasting cell lines, the NIH-T3T line, derived from mouse fibroblasts, and the HT-29 line, obtained from colon adenocarcinoma. The results obtained suggest the possibility of a transcriptional correlation between *PLK1* and *INCENP*, which sheds light on the understanding of the mechanisms associated with the GI phenomenon in the process of neoplastic transformation.

PALABRAS CLAVES

Inestabilidad genómica, *INCENP*, *PLK1*, RT-qPCR, NIH-3T3, HT-29

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad de origen molecular que se caracteriza por la pérdida de la identidad celular en un contexto tisular específico. Su desarrollo está asociado a la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas (Meza-Junco et al., 2006; Monzón et al., 2011). Este proceso puede ser desencadenado por diversos factores, como la exposición a sustancias químicas, radiación y errores en la replicación del ADN.

Se han propuesto diversas alteraciones características de las enfermedades neoplásicas, incluyendo el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Además, de estas marcas fundamentales para el proceso de transformación, se han propuesto, complementariamente, marcas emergentes, que comprenden la reprogramación del metabolismo energético, la evasión de la destrucción por el sistema inmune, el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la reprogramación epigenética no mutacional y características habilitantes que contribuyen a la progresión tumoral, entre las que se incluyen la inestabilidad genómica, la inflamación promotora del ambiente tumoral, los microbiomas polimórficos y las células senescentes (Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

La inestabilidad genómica (IG) es una característica fundamental del cáncer, en la que el genoma es propenso a experimentar mutaciones o daños en su estructura y secuencia de ADN. La integridad del genoma está vigilada y protegida por varios mecanismos, como la replicación y reparación del ADN, la segregación de los cromosomas en mitosis y el mantenimiento de los telómeros. Cuando dichos mecanismos se ven alterados se genera IG (Duijf et al., 2019).

La IG se manifiesta de diversas maneras, siendo la inestabilidad cromosómica (CIN) la más común en la mayoría de los tipos de cáncer. En la CIN las células cancerosas experimentan una alta tasa de cambios en su estructura y número de cromosomas en comparación con células normales, generando dificultad para mantener la estabilidad en sus cromosomas durante procesos como la replicación y segregación cromosómica, lo que puede resultar en aneuploidías que van en detrimento del equilibrio en la información genética, y, por ende, de la homeóstasis celular (Negrini et al., 2010).

Varios autores han sugerido que procesos biológicos, mecanismos celulares y genes podrían ser desencadenantes de la IG. Sin embargo, comprender este sistema tan complejo mediante la identificación y análisis individual de cada componente resulta insuficiente para obtener una visión integrada de los desencadenantes. Se requiere una integración de toda esta información para una comprensión sistémica y concatenada de los diversos factores moleculares que conllevan a la aparición de la IG. Entre los genes identificados como desencadenantes de la IG se encuentran aquellos pertenecientes a la familia de *las Polo-like kinases (PLK1)*. *PLK1* regula varios aspectos clave del ciclo celular, como la progresión de la mitosis, específicamente en el punto de control G2/M, lo que permite la transición de la fase G2 a M, así como la segregación cromosómica y la citocinesis. La fosforilación mediada por *PLK1* facilita el correcto acoplamiento del huso mitótico en el momento y lugar adecuados de la división mitótica (Schmucker & Sumara, 2014; Zitouni et al., 2014). La sobreexpresión de este gen puede provocar errores en estos procesos, dando lugar a la formación de células binucleadas, CIN y aneuploidías, lo que puede contribuir al desarrollo de cáncer en humanos (Cunningham et al., 2020).

PLK1 como regulador maestro del proceso de segregación cromosómica, controla otros elementos fundamentales que contribuyen a la sincronía dicho proceso en tiempo y espacio, así, existen pocos estudios en los que se reporte papel de *INCENP* como inductor de IG, sin embargo, se cree que podría estar implicado, debido a su participación en el *Cromosoma*

Passenger Complex (CPC, por sus siglas en inglés) (Suescum et al, en revisión), ubicado en el centro del cromosoma, donde desempeña un papel de regulación en los procesos de división celular asociados a la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la citocinesis (van der Waal et al., 2012). Se cree que existen dos complejos CPC durante la mitosis, el primero se compone de cuatro subunidades no enzimáticas *AURORA-B*, *SURVIVINA*, *INCENP* Y *BOREALINA*, que determinan la actividad, localización, estabilidad y posiblemente la especificidad del sustrato. En el segundo complejo sólo se encuentra *INCENP* y *AURORA-B* posible responsable de la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 durante la mitosis. La inhibición de la fosforilación de la histona H3 impide el inicio de la condensación cromosómica y la entrada en mitosis (Hsu et al., 2000; Gassmann et al., 2004; Vader et al., 2006).

En este contexto, *INCENP* desempeña un papel esencial en la regulación de la división celular y la segregación cromosómica. Por lo tanto, este trabajo pretende determinar la potencial asociación entre *INCENP* y *PLK1*, teniendo como objetivo general la validación experimental del modelo matemático de inestabilidad genómica que asocia la expresión de dichos genes, mediante su medición transcripcional vía qPCR, para definir el rol del gen *INCENP* en los procesos asociados al fenotipo de inestabilidad genómica. Para alcanzar este objetivo, se establecieron los siguientes objetivos específicos: (a) Lograr capturar transcripcionalmente la expresión del gen *INCENP*, mediante el diseño de primers apropiados para su amplificación en distintas líneas celulares, que permita evaluar comparativamente la expresión del gen en experimentos de qPCR. (b) Contrastar la expresión del gen *INCENP* en distintas líneas celulares, a través de experimentos de PCR en tiempo real, que permita caracterizar sus patrones de expresión en líneas con fenotipos contrastantes de inestabilidad genómica. (c) Interpretar los resultados experimentales, a través de su contextualización biológica, para proponer un modelo explicativo sobre el papel del gen *INCENP* en el fenotipo de inestabilidad genómica.

METODOLOGÍA

Condiciones de cultivo celular

Se emplearon cultivos de las líneas celulares NIH-T3T de fibroblastos embrionarios de ratón (*Mus musculus*) y HT-29 de adenocarcinoma de colon (*Homo sapiens*). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM completo, suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina al 1%, y 1% de penicilina-estreptomicina. Para ambas líneas celulares se sembraron aproximadamente 100.000 células en 4 ml de medio, en flasks de cultivo de 25 cm², y se mantuvieron en incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Los cultivos se mantuvieron hasta que alcanzaron una confluencia del 80%, momento en el cual se realizaron los pases necesarios para asegurar la viabilidad y la sobrevivencia del cultivo durante el período de experimentación

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy Mini Kit de Qiagen® y se siguieron las instrucciones procedimentales de la compañía. La cantidad y calidad del ARN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoPhotometer N120 (Implen™). Posteriormente, a partir de 1 µg de ARN obtenido, se realizó la retrotranscripción del ARN a DNA complementario (cDNA) utilizando el kit Transcriptor Universal cDNA Master (Roche®) siguiendo el protocolo de síntesis del fabricante. Utilizando el termociclador TC1000-G con el

siguiente programa de amplificación: anillamiento de primers a 25 °C durante 5 minutos, retrotranscripción a 55°C por 10 minutos, denaturación a 85°C durante 5 minutos y finalizando con una temperatura de 4°C para mantener estables a los ácidos nucleicos.

Diseño de primers

Tomando las secuencias codificantes de los genes *INCENP* y *PLK1* de las especies *H. sapiens* y *M. musculus*, disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el gen *INCENP*, se utilizaron las secuencias codificantes con números de accesoión NM_001040694.2 y NM_001369356.1 correspondientes a *H. sapiens* y *M. musculus* respectivamente. Para el gen *PLK1*, se emplearon las secuencias con números de accesoión NM_005030.6 y NM_011121.4. Posteriormente, con el propósito de identificar las regiones conservadas entre ambas especies, se realizaron alineamientos múltiples para cada gen utilizando el Software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), con los siguientes parámetros: penalidad por apertura de gaps = 10, penalidad por extensión de gap = 1 y seleccionando la matriz IUB para la estimación de pesos por sustituciones.

El diseño de primers, se realizó mediante el software Vector NTI (Vector NTI Advance 11.0 Download (Free) – Informer Technologies, Inc.) para analizar las propiedades termodinámicas. Se consideraron fragmentos con una longitud entre 12 y 25 pares de bases (PB), manteniendo una temperatura de fusión (Tm) cercana a los 60 °C, así como un equilibrio aproximado del 50% de guaninas y citosinas (Dieffenbach et al., 1993). Además, se evitó la formación de dímeros y loops. Posteriormente, se seleccionaron los primers Forward (FW) y Reverse (RV) que generaron amplicones de entre 120 a 180 pb. Estos fueron sometidos a un análisis para elegir las combinaciones que mostraran la menor cantidad de dúplex o, en su defecto, la menor cantidad de energías negativas. Esto asegura que la formación de dúplex entre el primer FW y RV no sea termodinámicamente desfavorable, facilitando el proceso de amplificación.

Una vez seleccionados los pares de primers que cumplieran con los criterios mencionados, se procedió a validar su especificidad utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se esperaba que entre los resultados más relevantes se identificara el gen y la especie correspondiente a cada primer.

Validación de primers por curvas de denaturación

Para validarla calidad de los primers diseñados, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real. La qPCR se realizó en placas de 384 pozos, evaluando tres réplicas técnicas por cada réplica biológica de cada línea celular analizada. Para cada reacción se utilizaron 3µl de cDNA a una concentración de 2 ng/µl y 7µl del mix de amplificación (KiCqStart® SYBR® Green qPCR Ready Mix™ de Sigma-Aldrich) que contenía 1 µl de cada primer a una concentración final en la reacción de 2.5 µM y el fluoróforo de detección SYBR Green. El proceso de amplificación se realizó, utilizando el termociclador QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) con el siguiente programa de amplificación: período de incubación a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos continuos de amplificación (95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 20 segundos), finalizando con una curva de desaturación para determinar la

temperatura específica a la cual caía la fluorescencia, para así determinar el número de amplicones presentes por reacción de amplificación.

Determinación de los valores de expresión de los genes *INCENP* y *PLK1*

Para la determinación de los valores de expresión relativa de los genes *INCENP* y *PLK1* se realizó el procedimiento descrito en el numeral anterior (validación de primers por curvas de denaturación), complementado con un análisis de expresión mediante el método de cuantificación relativa 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen 2001) contrastando la línea celular NIH-3T3 (control) con la línea HT-29 (tratamiento). La expresión de los genes *INCENP* y *PLK1* se normalizó utilizando el gen *YWHAZ* como normalizador. Finalmente, se realizaron pruebas *T-student* pareadas para determinar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los valores de expresión génica.

RESULTADOS

Diseño de primers

- **Alineamientos**

Utilizando las secuencias NM_001040694.2 *H. sapiens* y NM_001369356.1 *M. musculus* para *INCENP*, y NM_005030.6 *H. sapiens* y NM_011121.4 *M. musculus* para *PLK1*, obtenidas de la base de datos NCBI, se identificaron 5 fragmentos de regiones conservadas entre *H. sapiens* y *M. musculus* tanto para *INCENP* (Tabla 1) como para *PLK1* (Tabla 2). Se calculó el porcentaje de homología para cada fragmento, evaluando las coincidencias entre las bases de las secuencias.

Tabla 1: Regiones de alta homología para el gen *INCENP* entre *Homo sapiens* y *Mus musculus*.

| Fragmento | Alineamiento | % de Homología | |
|-----------|---|----------------|-----|
| 1 | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 ATGGGGACGACGGCCCGAGGGCCATTCACTGCTGGAGCTATGTGACCAGAAGCTCATG ATGGGGACCACAGCCCGAGGGCTATTGGCTTCTGGATCTATGTGACCAGAACTCCTG ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 60 60 | 85% |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 GAGTTTCTCTGCAACATGGATAATAAGGACTTGGTGTGGCTTGAGAAATCCAAGAGGAG GACTTTGTCTGCAATGTGGACAACAAGGACTTCATGTGGCTCAAGGAGATTGAGGGAG ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 120 120 | |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 GCCGAGCGCATGTTCCACCAGAGAATTACAGAAAGAGCCAGAGCTGATGCCCCAAAACACT GCTGAGCGCATGTTTATCAGAGAATTAGCAATGAGCCAGAGCTGATGCCAAAATCCT ** ***** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 180 180 | |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 TCTCAGAAGAACCAGCGAAGAAGACGGATTCTTATGTTCAGGATGAAAACAGAGAT TCTCAGAAAAACCGTCGGAAGAAGAGGGGTTGTTAATCACTTCAAGGATGAAAACAGAGAT ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 240 240 | |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 CCCATCAGGAGAAAGTTATCCCGCAGAAAGTCTCGGAGCAGCCAGCTGAGCTCCCGACGC CCCGTAGGAAAAGTTATCCCGCAGAAAGTCTCGGAGCAGTCAAGTGGGTACCCGGCAC ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 300 300 | |
| 2 | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 GCTACACCCAGGACCCCAAGGGTCAAGGGTGGGACGGGGCGGTCTGGCTTAAGCTC GCTACCCCTCAGAGCCCAAGAACGAGGGTGGGAAAGACGTTCTGTTTCAAGCTC ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 771 699 | 69% |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 AGGATTGCGCAGGTCTCCCTGGCCACGGACTCGCCAGCCTTCCAGATTCTCCATGG AAGATTGCTCGGGCTCTGGGGCTGCAGGACTCTCTGGCTCTACAGACTCACCATGG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 831 759 | |
| | NM_001040694.2:165-2921 NM_001369356.1:163-2805 CGGGAGCGGGTGTGGCTCCATCTCTCGGGAACTTCTCCACGCCACGGGGCTCTGC CAAGAGCGGGTCTTCTCTATCTGCTGAATAACTCTGCCCCAACACAGCAAGAGC * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * | 891 819 | |

| | | | | |
|----------|--|--|--|-----|
| 3 | NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 | CAAGTCTTAGCCCAAGTAAGTCTCTGTTGGCCAAACAGGAAAGTGTTCGCCAGGGGCG GTGCCACTAGCTCGAAGTATAATTGGTGGCCAAACAGGAAATGGCAGTCGCAGATCA ***** AGCAGAAGGCTTGCACAAGAGCTGCCAAGAGCCAGCTGCTTGGCCGCATCATCTGT AGCAGAAGGATTGCCAAGAGCTGCCAAGAGCCAGAGGCCCTCTGCTCGAATCATTTGT ***** CACAGTTACTTGGAGAGGCTCTGAATGTTGAGGTGCCCAAGGAAAGTGTGCTGAGCAG CACAGTTACTTGGAGAGGCTCTGAATGTTGAGGTGCCCAAGGAAATGGCTGAGCAG ***** | 1005 933 1065 993 1125 1053 | 78% |
| 4 | NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 | GTCATGAAGTCTTTTATTAAGCGCAACTCCCTGCGCAGCCCAAGTGCAGCTTC GTCATGAAGTCTTTTATTAAGCGCAACTCCCTGCGCAGCCCAAGTGCAGCTTC ***** GTCGAGAAGGAGCCGACGCCCTGGAGAATCTGCGGCGGAAGGAGGCGGAGCAGCTG GTTGAGAAGGAGCCGACGCCCTGAGAGCCCTGCGCAGGAAAGGAGGCGGAGCAGCGG ***** CGCAGGCAAGAGTGGAGGAGACAAGCGCGGCGGCTGGAGGAGGTGAAGCTGAAGCT CGCAGACAGAAGTAGAGGAAGACAAGCGCGGCGCAGTGGAGGAGGTGAAGCTGAAGCT ***** GAGGAACGCCCTCCGCAAGTGTGTCAGGCGCCGAGCGGGTGAGCAGATGAAGAGGAG GAAGAGCGCCTCCGCAAGTGTGTCAGGCGCGTGAAGAGGTGAAGAGGAGGAGAA ***** AAGAAGAAGCAGATTGAGCAGAAGTTTGCTCAGATCGACGAGAAGCTGAGAAGGCCAAG AAGAAGAAGCAGATTGAGCAGAAGTTTGCTCAGATTGATGAGAAGCAGAAGAGGCTAAG ***** | 1602 1527 1662 1587 1722 1647 1782 1707 1842 1767 | 90% |
| 5 | NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 NM_001040694.2:165–2921 NM_001369356.1:163–2805 | GAGAGGAGCTGCAGGAGCGGAGAAGGCCCTGCGGCTGCAGAAGGAGCAGTGCAGAGG AAGAGGAGATGCAGGAGAGAGAGAAGCCCTGCACTCCAAAGGAAGGAGGCTCAGAAG ***** GAACCTGGAGGAAGAAAGAAAGGAAGAGCAGCAGCTGCTGGCTGAGCGGCAGTGCAG GAACCTGGAGGAAGAAAGAAAGGAAGAGCAACAGCGCTTGGCTGAGCAGCACTGTCAG ***** GAGGAGCAAGGAAGAAAGCAAGGAGGAGCAGGCGGCAGCAAGGCCTGAATGTGACT GAGGAGCAGCAAGAAAGCTAAGGAGGTGGCAGCAGCAAGAAAGTCTGAACATGACT ***** GTGGACGTGCAGTCTCCAGTTGTACCTCATATCAGATGACTCCGCAAGGGCACAGGGCC GTGGATGTGCAGTCTCCTGTTGTACCTCATATCAATGACTCCACAGGACCCAAATCC ***** CTCCCAAGATCAACCAGATAACTACGGGATGGACTGAATAGCAGCAGCTCCAGGAT ATCCCAAGATCAGCTAGCAGATTTGATGGACTAAATAGTGTGACTCCAGCAT ***** GATGAGGCCATCCCGAAGGCCATCCACCTGGGCCAGGACCCGCTCAGCCAG GATGATCCCAACCCCGAAGCCATCCCTCTGGGCCAAGGACCCCAACTCAGCCAG ***** GCTATCATTACCAGTACTACCCACCCAGCAACTCTTGGAGCTCTTTGGAACATTCTC GCCATTGTCACCAAGTACTACCACTCCAAACATTCTAGAGCTCTTGGATCTATTCTC ***** CCACTGGACTTGGAGGATATCTCAAGAAGAGCAAGCCCCTATCAAGGCACCAAGC CCACTGGACTTGGAGGACTCTTAAAGAGAGGAGACTGCTCAACAAGCAGCACTAGC ***** TCTGCTGTGGAAGTCCAGGCCCTGCAAGGCGCCAGGCTCCCAAGCAGCTGAGGCTAC TCTGCTGTTGGAAGTCAACCCCTGAAAGCACCATGTCCCGCAGCAGTGGGAGT ***** | 2259 2163 2319 2223 2379 2283 2439 2343 2499 2403 2559 2463 2619 2523 2679 2583 2739 2643 | 82% |

En el alineamiento para *INCENP*, el fragmento 4 presentó el mayor porcentaje de homología con un 90%. A partir de este fragmento, se diseñaron tres primers. El segundo mejor resultado lo obtuvo el fragmento 1, con un 85% de homología, a partir del cual se diseñaron dos primers adicionales. Los primers diseñados presentaban un máximo de una base diferente entre las secuencias.

Tabla 2: Regiones de alta homología para el gen *PLK1* entre *Homo sapiens* y *Mus musculus*.

| Fragmento | Alineamiento | % de Homología |
|--|---|--|
| 1 NM_005030.6:45–1856 NM_011121.4 NM_005030.6:45–1856 NM_011121.4 NM_005030.6:45–1856 NM_011121.4 NM_005030.6:45–1856 NM_011121.4 NM_005030.6:45–1856 NM_011121.4 | CCGGAGTCTAGTGACCCACGAGCCGCGCGCTATGTGCGGGGCCGTTTTGGGGC CCGGAGTCTAGTGACCCACGAGCCGCGCGCATGTATGACGGGGCCGTTTTCTGGGT ***** AAGGCGGCTTTGCAAGTGCCTCGAGATCTCGACGCGGACACCAAGGAGGTGTTCGGG AAAGGAGGCTTCCCAATGCTTGCAGATCTCAGACGACACCAAAAGAGGTGTTCCGA ***** GGCAAGATTGTGCCTAAGTCTCTGCTCAAGCCGACAGGAGGAGAAGATGTCATG GGCAAGATGCTGCTAAGTCTGCTCAAGCCCACGAAAGGAGAAGATGCTATG ***** GAAATATCAATTACCAGCAGCTCGCCACCAAGCAAGTGTAGGATTCACGGCTTTTT GAGATCTCAATTACCAGCAGCTAGCACCAACAGCTGTAGGCTTCATGACTTTTTT ***** GAGGACAAGGACTTCGTTGTTGGAGCTCTGCAGCGGAGGCTCTCTCTGGAG GAGGACAAGGACTTCGTTGTTGGAGCTCTGCAGGAGGCTCTCTCTGGAG ***** | 180 180 240 240 300 300 360 360 420 420 |

| | | | |
|---|---|---|-----|
| 2 | <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> | <p>CTGCACAAGAGGAGGAAGCCCTGACTGAGCCTGAGGCCGACTACTACCTACGGCAAATT 480 CTGCACAAGAGGAGGAAGCCCTGACTGAGCCTGAGGCCGACTACTACCTGCGACAGATA 480 ***** ** ** *</p> <p>GTGCTTGGCTGCCAGTACCTGCACCAGAACCGAGTTATTCATCGAGACCTCAAGCTGGGC 540 GTCTGGCTGCCAGTACCTGCACCAGAACCGAGTTATTCATCGAGACCTCAAGCTGGGC 540 ** ** ***** ** * ** ***** *****</p> <p>AACCTTTTCTGAATGAAGATCTGAGGTTGAAATAGGGGATTTGGACTGGCAACCAA 600 AACCTTTTCTGAATGAAGATCTGAGGTTGAAATAGGGGATTTGGACTGGCAACCAA 600 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>GTCGAATATGACGGGGAGAGGAAGAACCTGTGTGGGACTCCTAATTACATAGCTCCC 660 GTGGAATATGACGGGGAGAGGAAGAACCTGTGTGGGACTCCTAATTACATAGCTCCC 660 * ***** ** * ***** ***** ***** *****</p> <p>GAGGTGCTGAGCAAGAAAGGCCACAGTTTCGAGGTGGATGTGTGGTCCATTGGGTGATC 720 GAGGTGCTGAGCAAGAAAGGCCACAGTTTCGAGGTGGATGTGTGGTCCATTGGGTGATC 720 ***** ***** ** ***** ***** ***** *****</p> | 88% |
| 3 | <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> | <p>ATGTATACCTTGTAGTGGGCAAAACCCCTTTTGGAGACTTCTGCCTAAAAGAGACCTAC 780 ATGTATACCTTGTAGTGGGCAAAACCCCTTTTGGAGACTTCTGCCTAAAAGAGACCTAC 780 ***** ***** ** ** ***** ** *****</p> <p>CTCCGGATCAAGAAAGATGAATACAGTATTTCCCAAGCACATCAACCCCGTGGCCGCTCC 840 CTCCGGATCAAGAAAGATGAATACAGTATTTCCCAAGCACATCAACCCCGTGGCCGCTCC 840 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>CTCATCCAGAAGATGCTTCAGACAGATCCCCTGCCCCGCAACCTTAACGAGCTGCTT 900 CTCATCCAGAAGATGCTTCAGACAGATCCCCTGCCCCGCAACCTTAACGAGCTGCTT 900 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>AATGACGAGTTCTTTACTTCTGGCTATATCCCTGCCGCTCTCCCATCACCTGCCTGACC 960 AATGACGAGTTCTTTACTTCTGGCTATATCCCTGCCGCTCTCCCATCACCTGCCTGACC 960 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>ATTCACCAAGTTTTTGGATGCTCCAGCAGCCTGGACCCGAGCAACCGGAAGCCCTC 1020 ATTCACCAAGTTTTTGGATGCTCCAGCAGCCTGGACCCGAGCAACCGGAAGCCCTC 1020 ***** ***** ** ***** ***** *****</p> <p>ACAGTCTCAATAAAGGCTTGGAGAACCCTGCTGAGCTGCCCGGGAAGAAAGAGAA 1080 AAAGTCTCAATAAAGGCTTGGAGAACCCTGCTGAGCTGCCCGGGAAGAAAGAGAA 1080 * ***** ***** ***** ***** *****</p> | 91% |
| 4 | <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> | <p>CTGCACAGTGTCAATGCCTCAAGCCCTGGAGCGTGGGCTGGTCAAGCAAGAGGAGGCT 1200 CTGCACAGTGTCAATGCCTCAAGCCCTGGAGCGTGGGCTGGTCAAGCAAGAGGAGGCT 1200 *** ***** ***** ***** *****</p> <p>GAGGATCTGCGTGCATCCCCTCTTCTGGGTCAAGCAAGTGGGTGGACTATTGGACAAG 1260 GAGGATCTGCGTGCATCCCCTCTTCTGGGTCAAGCAAGTGGGTGGACTATTGGACAAG 1260 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>TACGGCTTGGGTATCAGCTCTGTGATAACAGCGTGGGGTGGCTTCTCAATGACTCAACA 1320 TACGGCTTGGGTATCAGCTCTGTGATAACAGCGTGGGGTGGCTTCTCAATGACTCAACA 1320 ** ***** ***** ***** *****</p> <p>CGCCTCATCTCTACAATGATGGTGACAGCCTGACGATACATAGAGCGTGCAGGCACTGAG 1380 CGCCTCATCTCTACAATGATGGTGACAGCCTGACGATACATAGAGCGTGCAGGCACTGAG 1380 ***** ** ***** ***** ***** *****</p> <p>TCCTACTCATCTGAGCTCCCATCCCAATTCCTTGTGAAGAAGATCACCTCCTTAAA 1440 TCCTACTCATCTGAGCTCCCATCCCAATTCCTTGTGAAGAAGATCACCTCCTTAAA 1440 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>TATTTCCGCAATTAACATGAGCGAGCACTTGTGAGGCGAGTGCACATCACGCCGCGC 1500 TATTTCCGCAATTAACATGAGCGAGCACTTGTGAGGCGAGTGCACATCACGCCGCGC 1500 ***** ***** ***** ***** *****</p> | 91% |
| 5 | <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> <p>NM_005030.6:45-1856 NM_011121.4</p> | <p>GAAGGTGATGAGCTGCCCGGCTGCCCTACCTACGGACTGGTTCCGCAACCGCAGCGCC 1560 GAAGGTGATGAGCTGCCCGGCTGCCCTACCTACGGACTGGTTCCGCAACCGCAGCGCC 1560 ***** ** ***** ***** ***** *****</p> <p>ATCATCTGCACTCAGCAACGGCAGCGTGAGATCAACTTCTTCCAGGATCACCAAG 1620 ATCATCTGCACTCAGCAACGGCAGCGTGAGATCAACTTCTTCCAGGATCACCAAG 1620 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>CTCATCTGTGCCACTGATGGCAGCGTGCATCTACATCAGCAGAAAGCGGACTTCCGC 1680 CTCATCTGTGCCACTGATGGCAGCGTGCATCTACATCAGCAGAAAGCGGACTTCCGC 1680 ** ** ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>ACATACCGCTGAGTCTCTGGAGGAGTACGGCTGCTGCAAGGAGCTGGCCAGCCGGCTC 1740 ACATACCGCTGAGTCTCTGGAGGAGTACGGCTGCTGCAAGGAGCTGGCCAGCCGGCTC 1740 ** ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>CGCTACGCCCGCACTATGGTGGACAAGCTGCTGAGCTCAGCTCGGCCAGCAACGGTCTC 1800 CGCTACGCCCGCACTATGGTGGACAAGCTGCTGAGCTCAGCTCGGCCAGCAACGGTCTC 1800 ***** ***** ***** ***** *****</p> <p>AAGGCCTCTAA 1812 AAGGCCTCTAG 1812 *****</p> | 92% |

Para *PLKI*, el fragmento con mayor porcentaje de homología fue el fragmento 5 con un 92% de coincidencias, seguido por los fragmentos 3 y 4 cada uno con un 91%. Los cuatro primers diseñados para este gen se obtuvieron de los fragmentos 1, 2 y 4, con dos primers provenientes del fragmento 2, todos con un máximo de una base diferente entre las secuencias. La ausencia de primers en los fragmentos con mayor porcentaje de homología se debió a que sus propiedades termodinámicas no eran óptimas.

- **Secuencias de primers**

Con los 5 fragmentos de las regiones conservadas para *INCENP* y *PLK1*, se diseñaron primers FW y RV. Se seleccionaron aquellos que presentaban las mejores propiedades termodinámicas, considerando la temperatura de fusión o anillamiento (T_m), el porcentaje de guaninas y citosinas, y la menor cantidad de dímeros y loops. Para *INCENP*, se identificaron 5 primers FW y 2 primers RV (Tabla 3), mientras que para *PLK1* se encontraron 4 primers FW y 3 RV (Tabla 4).

Tabla 3: Primers diseñados para el gen *INCENP*.

| Gen | Secuencia | Propiedades termodinámicas | | | |
|------------|---------------------------|----------------------------|-----|--------------|------------|
| | | T_m (C) | GC% | # de dímeros | # de loops |
| FW1 | GAGAATTCAGCAATGAGCCAGAGC | 62.9 | 48 | 5 | 2 |
| FW2 | AGGAGGCTGAGCGCATGTT | 67.5 | 65 | 4 | 0 |
| FW3 | TGCGACGGAAGGAGGAGGC | 69.3 | 70 | 0 | 0 |
| FW4 | GGAGGAGGCCGAGCAGCG | 71 | 74 | 1 | 0 |
| FW5 | GGCGACTGGAGGAGGTGAAG | 69 | 67 | 0 | 0 |
| RV1 | ACTTTCTGCGGGATAACCTTTTC | 60.7 | 46 | 0 | 0 |
| RV3 | TGAGCAAACCTTCTGCTCAATCTGC | 61.9 | 48 | 4 | 2 |

Tabla 4: Primers diseñados para el gen *PLK1*.

| Gen | Secuencia | Propiedades termodinámicas | | | |
|------------|------------------------|----------------------------|-----|--------------|------------|
| | | T_m (C) | GC% | # de dímeros | # de loops |
| FW1 | TAGTGGACCCACGCAGCCG | 68.2 | 60 | 2 | 0 |
| FW2 | TGGGTCAGCAAGTGGGTGGA | 68 | 60 | 0 | 0 |
| FW3 | GACCTCAAGCTGGGCAACCTCT | 67.2 | 59 | 1 | 0 |

| | | | | | |
|------------|---------------------------|------|----|---|---|
| FW4 | GCTGGGCAACCTCTTCCTGA | 65.9 | 60 | 0 | 0 |
| RV1 | TGAGCAGCAAAGACTTAGGCAC | 61.1 | 50 | 2 | 0 |
| RV2 | TGTAGAGAATCAGGCGTGTTGAGTC | 62.6 | 48 | 2 | 1 |
| RV3 | GACCACACATCCACCTCAAACTG | 63.4 | 50 | 0 | 0 |

- **Combinaciones de primers**

Se seleccionaron combinaciones de primers FW y RV para *INCENP* (Tabla 5) y *PLK1* (Tabla 6) que permitían la generación de amplicones entre 150 y 180 pb. Se seleccionaron aquellas combinaciones que, al ser sometidas al análisis dúplex, mostraron una menor formación de éstos o que presentaron energías de entalpía cercanas a cero indicando una menor probabilidad de que el primer FW se una al primer RV. Las combinaciones de primers se nombraron con la inicial del gen seguida de un número consecutivo.

Tabla 5: Combinaciones de primers para *INCENP*.

| Gen | Secuencia | | Combinación | Tamaño del amplicón | # de Dúplex |
|------------|------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| I1 | FW | AGAGAATTCAGCAATGAGCCAGAGC | FW1-RV1 | 134 | 6 |
| | RV | GACTTTCTGCGGGATAACCTTTTC | | | |
| I2 | FW | GAGGAGGCTGAGCGCATGTT | FW2-RV1 | 158 | 4 |
| | RV | GACTTTCTGCGGGATAACCTTTTC | | | |
| I3 | FW | CTGCGACGGAAGGAGGAGGC | FW3-RV3 | 183 | 4 |
| | RV | CTGAGCAAACCTTCTGCTCAATCTGC | | | |
| I4 | FW | AGGAGGAGGCCGAGCAGCG | FW4-RV3 | 137 | 6 |
| | RV | CTGAGCAAACCTTCTGCTCAATCTGC | | | |
| I5 | FW | CGGCGACTGGAGGAGGTGAAG | FW5-RV3 | 123 | 4 |
| | RV | CTGAGCAAACCTTCTGCTCAATCTGC | | | |

Tabla 6: Combinaciones de primers para *PLK1*.

| Gen | Secuencia | | Combinación | Tamaño del amplicón | # de dúplex |
|-----------|-----------|--------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| P1 | FW | TAGTGGACCCACGCAGCCG | FW1-RV1 | 141 | 3 |
| | RV | TGAGCAGCAAAGACTTAGGCAC | | | |
| P2 | FW | TGGGTCAGCAAGTGGGTGGA | FW2-RV2 | 109 | 2 |
| | RV | TGTAGAGAATCAGGCGTGTGAGTC | | | |
| P3 | FW | GACCTCAAGCTGGGCAACCTCT | FW3-RV3 | 182 | 2 |
| | RV | GACCACACATCCACCTCAAACTG | | | |
| P4 | FW | GCTGGGCAACCTCTTCCTGA | FW4-RV3 | 174 | 3 |
| | RV | GACCACACATCCACCTCAAACTG | | | |

Validación experimental de los primers diseñados

Las curvas de denaturación se generan gracias a la detección de la fluorescencia producida por el SYBR Green y detectada por el termociclador. Luego de los ciclos sucesivos de amplificación se induce un incremento lento y constante de la temperatura a la que se someten las muestras. El incremento de la temperatura provoca la denaturación del cDNA, resultando en una caída abrupta del nivel de fluorescencia. Esta caída se representa como un pico de temperatura al cual se pierde la señal fluorescencia y es típica de cada amplicón generado. Productos específicos de amplificación tendrán un único pico de temperatura (Adams, 2020).

En el caso de *INCENP* se evaluaron 5 primers (Figura 1), de los cuales I2 presentó el mejor resultado, mostrando un solo pico de denaturación, lo que indica que los primers FW y RV diseñados son específicos para amplificar la región conservada en humano y ratón. I1 presenta dos picos muy cercanos entre sí, sugiriendo una menor especificidad en comparación con I2, pero con la posibilidad de mejorar su especificidad modificando su temperatura de anillamiento. Por otro lado, los primers I3, I4 e I5 mostraron múltiples picos de denaturación, lo que indica que no son específicos para amplificar *INCENP* simultáneamente en las líneas celulares de *H. sapiens* y *M. musculus*. El normalizador *YWHAZ* mostró solo una temperatura de denaturación.

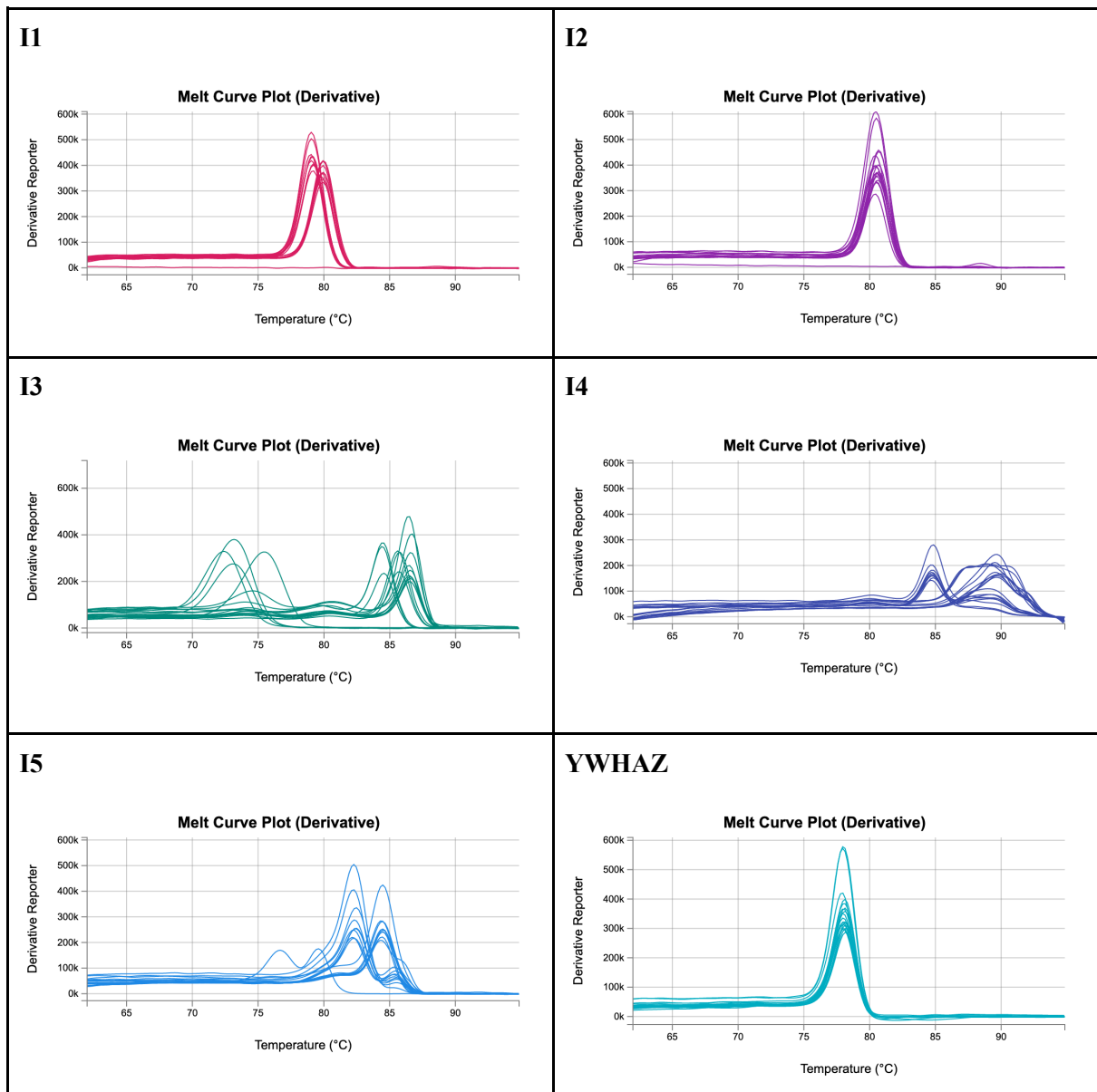


Figura 1: Picos de desnaturalización para el gen *INCENP*. La combinación de primers I1 presenta dos picos de desnaturalización muy cercanos entre sí, mientras que la combinación de primers I2 muestra un solo pico, lo que la convierte en la más precisa de todas las combinaciones de primers analizadas. Por su parte, I3, I4 e I5 presentan múltiples picos de desnaturalización. El normalizador *YWHAZ* presentó un solo pico de desnaturalización.

Para *PLK1* se evaluaron 3 combinaciones de primers (Figura 2), P3 resultó ser el más específico, mostrando un pico de denaturación bien definido, lo que indica una alta especificidad para amplificar la región seleccionada del gen en ambas especies evaluadas. En contraste, P1 fue el menos específico, seguido de P2, que presentó varios picos de denaturación cercanos.

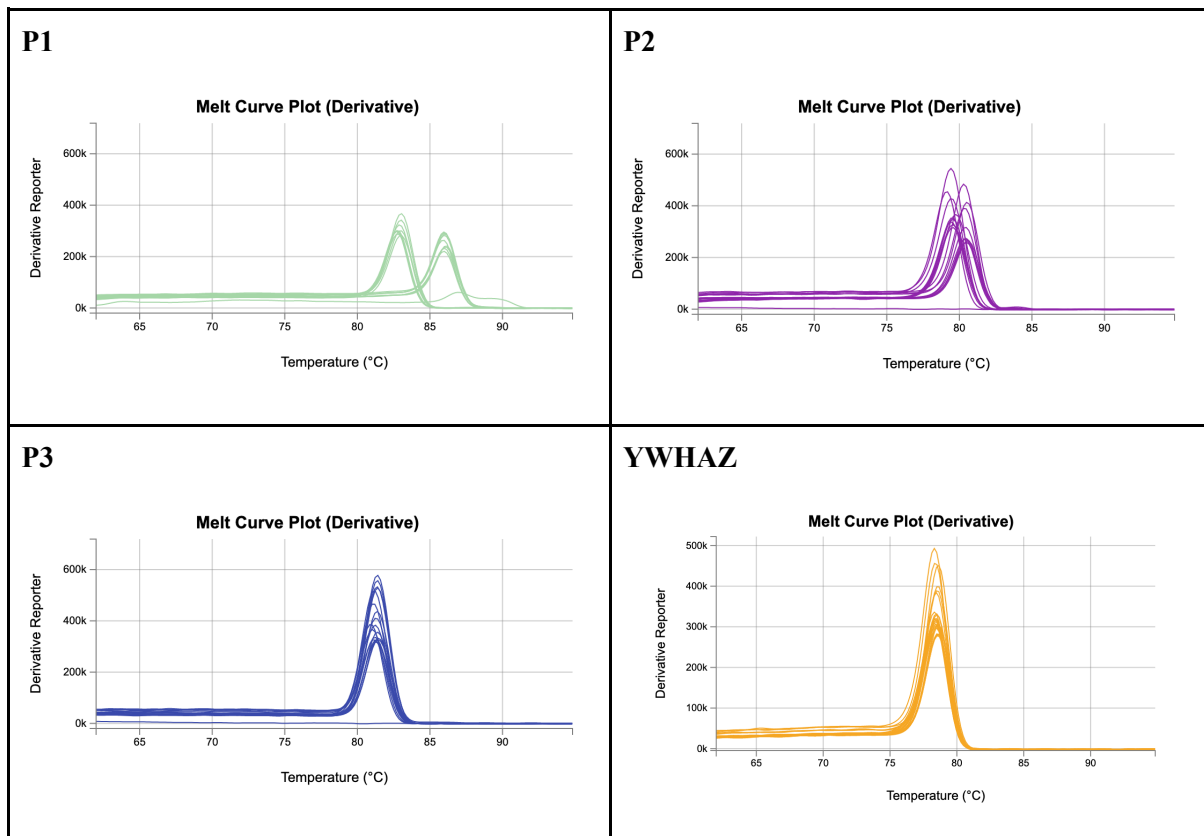


Figura 2: Curvas de denaturación para *PLK1*. La combinación de primers P1 y P2 presentan dos picos de desnaturalización muy cercanos entre sí, mientras que la combinación de primers P3 muestra un solo pico, lo que la convierte en la más precisa de todas las combinaciones de primers analizadas. El normalizador *YWHAZ* presentó un solo pico de desnaturalización.

Análisis del nivel de expresión relativa para *INCENP* y *PLK1*

El análisis de los niveles de expresión génica para *INCENP* (Figura 3) y *PLK1* (Figura 4) mostró un comportamiento similar. Se observó una disminución de la expresión en la línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon en *H. sapiens* en comparación con la línea celular NIH-3T3 de fibroblastos de *M. musculus*. La expresión de *INCENP* disminuyó en un 48% en la línea celular HT-29 en comparación con la línea de fibroblastos de ratón. De manera similar, la expresión de *PLK1* disminuyó en un 41% en la línea celular HT-29. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, debido a la alta variabilidad de los datos.

Expresión génica para *INCENP*

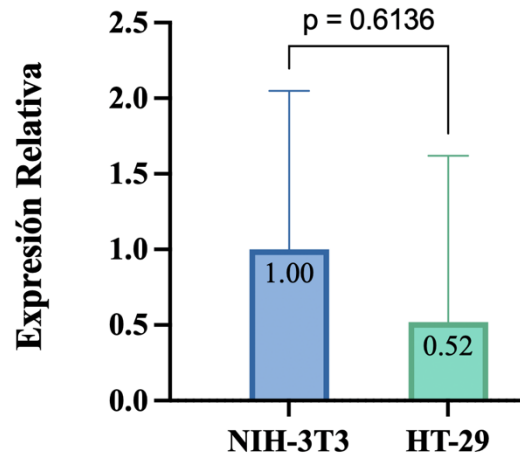


Figura 3: Expresión relativa para el gen *INCENP* en las líneas celulares evaluadas: Se muestra la disminución de la expresión génica de *INCENP* en la línea celular HT-29 en comparación con la línea celular NIH-3T3. A pesar de estas reducciones en la expresión, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Expresión génica para *PLK1*

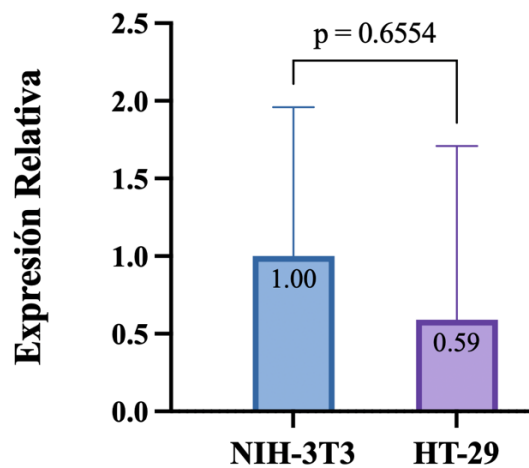


Figura 4: Expresión relativa para el gen *PLK1* en las líneas celulares evaluadas: Se muestra una disminución en la expresión génica de *PLK1* en la línea celular HT-29 en comparación con la línea NIH-3T3. A pesar de estas reducciones en la expresión, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Los alineamientos de secuencias para los genes *INCENP* y *PLK1* revelaron que existen regiones que preservan similitudes en las secuencias para ambos genes, permitiendo identificar regiones altamente conservadas, esto puede traducirse en una homología funcional para ambos genes, lo cual permitió el diseño adecuado de primers lo que conllevó a demostrar que los primers I2 y P3 son específicos. Esto puede atribuirse a que sus condiciones de temperatura de fusión (T_m) y el equilibrio de guaninas y citosinas favorecieron el correcto anillamiento a las regiones objetivo. El uso de una misma temperatura de fusión para todos los primers podría haber provocado que algunos como I1, P1 y P2, no funcionaran adecuadamente. La temperatura utilizada podría no haber sido óptima para los primers con T_m más bajos, lo que afectó su rendimiento (Dieffenbach et al., 1993).

En cuanto al nivel de expresión génica, se observó una tendencia: cuando la expresión de *INCENP* disminuye, la de *PLK1* también lo hace, sugiriendo una relación entre ambos genes. Esto podría deberse a que se ha reportado que la disminución de la expresión de *INCENP* interrumpe la localización de *PLK1* en el cinetocoro (Goto et al., 2004). No obstante, *AURORA B* debe fosforilar a *INCENP* para que se dé la localización de *PLK1*.

Aunque no se ha confirmado si *INCENP* es un sustrato directo de *PLK1*, esta quinasa es crucial para varios aspectos del funcionamiento de *INCENP* (Carmena & Earnshaw, 2006; Carmena et al., 2012). Experimentalmente, en el presente estudio se observó una tendencia específica, así, cuando la expresión de *INCENP* disminuye, la de *PLK1* también lo hace, sugiriendo una relación entre ambos genes. Esto podría deberse a que se ha reportado que la disminución de la expresión de *INCENP* interrumpe la localización de *PLK1* en el cinetocoro (Goto et al., 2004).

PLK1 ha sido reportado como un oncogén relevante para la progresión del ciclo celular, ya que se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer (Yuan et al., 1997; Tokumitsu et al., 1999; Macmillan et al., 2001). Desempeña un papel crucial en la carcinogénesis y en la desregulación de los puntos de control del ciclo celular (Gheghiani et al., 2021; Jeong et al., 2018). Sin embargo, estudios recientes, también han indicado que *PLK1* puede actuar como un supresor tumoral, ya que la disminución en su expresión génica promueve la muerte celular. Cualquier forma de desregulación de *PLK1* puede generar aneuploidías. En casos de sobreexpresión, todas las cromátidas pueden ser llevadas a una misma célula hija, mientras que una baja expresión del gen puede impedir la segregación cromosómica. En ambos casos, se producen aneuploidías, que son características de la inestabilidad genómica (IG).

En cuanto a los valores de diferencias significativas obtenidos en las gráficas de expresión relativa para *INCENP* y *PLK1*, la falta de diferencias estadísticamente significativas se atribuye a la alta variabilidad de los datos. Una alta variabilidad dificulta la detección de diferencias reales entre las muestras.

CONCLUSIONES

Este estudio proporcionó evidencia experimental que permitió corroborar una relación en la expresión de *INCENP* y *PLK1*, sin embargo, no generó datos suficientes para determinar con certeza la participación de *INCENP* en la inestabilidad genómica. Esto podría deberse a la insuficiencia de los datos y al hecho de que este estudio se realizó con líneas celulares de dos especies distintas.

La expresión de *INCENP* y *PLK1* puede depender del cultivo celular, el uso de otras líneas celulares diferentes a HT-29 de adenocarcinoma de colon en estado más avanzado de transformación neoplásica, serían útiles para contrastar los resultados obtenidos en esta investigación. Para mejorar el proceso experimental en investigaciones futuras, se sugiere utilizar más réplicas biológicas provenientes de distintos cultivos celulares, lo que proporcionaría una mejor estimación de la respuesta biológica.

REFERENCIAS

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53
- Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2006). INCENP at the kinase crossroads. *Nature cell biology*, 8(2), 110-111.
- Carmena M, Pinson X, Platani M, Salloum Z, Xu Z, Clark, A. MacIsaac, F., Ogawa, H., Eggert, U., Glover, D. M., Archambault, V. & Earnshaw, W. C. (2012). Correction: The Chromosomal Passenger Complex Activates Polo Kinase at Centromeres. *PLOS Biology* 10(2): 10.1371
- Cunningham, C. E., MacAuley, M. J., Vizeacoumar, F. S., Abuhussein, O., Freywald, A., & Vizeacoumar, F. J. (2020). The CINs of polo-like kinase 1 in cancer. *Cancers*, 12(10), 2953.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3), S30-S37.
- Duijf, P. H. G., Nanayakkara, D., Nones, K., Srihari, S., Kalimutho, M., & Khanna, K. K. (2019). Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 25(7), 595-611.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L. & Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *The Journal of cell biology*, 166(2), 179-191.
- Gheghiani, L., Wang, L., Zhang, Y., Moore, X. T., Zhang, J., Smith, S. C., Tian, Y., Wang, Y., Turner, K., Jackson-Cook, C. K., Mukhopadhyay, N. D. & Fu, Z. (2021). PLK1 induces chromosomal instability and overrides cell-cycle checkpoints to drive tumorigenesis. *Cancer research*, 81(5), 1293-1307.
- Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg E. A. & Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase–anaphase transition. *Nature cell biology*, 8(2), 180-187.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). *The Hallmarks of Cancer*. *Cell*, 100(1), 57–70.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov* 12 (1): 31–46.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow J. M., Brame C. J., Caldwell J. A., Hunt D. F., Lin R., Smith M. M & Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102(3), 279-291.
- Jeong, S. B., Im, J. H., Yoon, J. H., Bui, Q. T., Lim, S. C., Song, J. M., Shim, Y., Yun, J., Hong, J. & Kang, K. W. (2018). Essential role of polo-like kinase 1 (Plk1) oncogene in tumor growth and metastasis of tamoxifen-resistant breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 17(4), 825-837.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Meza-Junco J, Montaña-Loza A & Aguayo-González Á. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1):56-70.
- Monzón, O. G., Mora Padilla, E., Torres Tobar, L., Gutiérrez, L. D., & Rubi, C. (2011). Bases moleculares del cáncer. *Revista Repertorio de Medicina Y Cirugía*, 20(4), 210–216.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. & Halazonetis, (2010).T. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 220–228.
- Schmucker, S., & Sumara, I. (2014). Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Molecular & Cellular Oncology*, 1(2).
- Suescum et al, (2024) The plk1 gene regulatory network modeling identifies three circuits for plk1-mediated genomic instability leading to neoplastic transformation, en revision en *Frontiers in molecular biosciences*.
- Vader, G., Medema, R. H., & Lens, S. M. A. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 173(6), 833–837.
- Van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C. C., van der Horst, A., & Lens, S. M. A. (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1407–1420.
- Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S. C., Guerrero, A., & Bettencourt-Dias, M. (2014). Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 433-452.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento por su amor y apoyo incondicional a mi mamá, Ana Julia Serna y a mi papá Guillermo Gallego, así como a mis hermanos Luis Miguel Gallego y Daniel Gallego y al Ingeniero Jaime Ospina.

A mis compañeros y amigos, gracias por su ánimo y respaldo a lo largo de este proceso. A los profesores que hicieron parte fundamental de mi formación como bióloga, especialmente a Mauricio Alberto Quimbaya Ph.D por compartir su conocimiento y guiarme en esta etapa crucial de mi vida. Finalmente, agradezco a la Universidad Javeriana Cali y al centro de investigación iOMICAS por proporcionarme los recursos y las instalaciones necesarias para desarrollar mi trabajo de grado.