

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Biología

Fecha: Mayo 20 del 2024.

Autores: Laura Vanessa Córdoba López.

Nombre Del proyecto: Comparación de la expresión del gen *PLK1* en las líneas celulares HEK 293 y HT 29.

Director: Mauricio Alberto Quimbaya Gómez -Ph.D.

Santiago de Cali, Mayo 20 del 2024

**Doctor
Mateo López Victoria
Director del Programa de Biología
Pontificia Universidad Javeriana Cali**

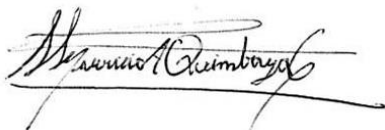
**Asunto: Entrega del trabajo de grado y solicitud de sustentación
de la estudiante Laura Vanessa Córdoba López.**

Apreciado Dr. López.

Con la presente carta quiero manifestar que el proyecto de grado titulado "*Comparación de la expresión del gen PLK1 en las líneas celulares HEK 293 y HT 29*" presentado por la estudiante Laura Vanessa Córdoba López está finalizado y listo para su proceso de evaluación y disertación.

Cualquier pregunta relacionada tanto con el trabajo de grado como de Laura, estaré atento a solucionarla.

Sinceramente,



Mauricio A Quimbaya G-Ph.D.
Profesor asociado al Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas
maquimbaya@javerianacali.edu.co
(+57-2)321-82-00-Ext: 8636.

Comparación de la expresión del gen *PLK1* en las líneas celulares HEK 293 y HT 29.

Laura Vanessa Córdoba López

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA CALI

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI 2024

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
 - 2.1 Las marcas distintivas del cáncer
 - 2.2 Polo-like Kinase 1
 - 2.3 HEK-293
 - 2.4 HT-29
3. JUSTIFICACIÓN
4. OBJETIVOS
 - 4.1 OBJETIVO GENERAL
 - 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS
5. METODOLOGÍA
 - 5.1 CULTIVO CELULAR
 - 5.2 RASPADO DE CÉLULAS
 - 5.3 EXTRACCIÓN DE ARN
 - 5.4 SÍNTESIS DE cDNA
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. REFERENCIAS

AGRADECIMIENTOS.

Primeramente, quisiera agradecer a mi familia y amigos más cercanos, en especial a mi madre, por siempre apoyarme, por siempre creer en mí y alentarme a continuar sin importar cuán difícil pudiera ser el camino. A todos los profesores que hicieron parte de mi proceso de formación, en especial al director de este trabajo de grado, quien a pesar de mis errores siempre supo guiarme para poder culminar este proyecto. Por último, quisiera agradecer especialmente a mis compañeros y colegas Rafael Cardenas, Jason Suescum y Andrés Pinchado por todo su apoyo e inspiración durante el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la pérdida de la identidad celular en un contexto tisular que inicialmente conduce a una proliferación descontrolada de las células transformadas. Debido al alto grado de complejidad y al gran número de factores que pueden desencadenar la pérdida de identidad celular que conlleva posteriormente a la formación de tumores, en los últimos años se han buscado nuevas aproximaciones para simplificar el estudio de los eventos celulares que pueden iniciar la tumorigénesis. Los modelos matemáticos son una alternativa que facilita el estudio de los mecanismos y redes de interacción molecular involucrados en el inicio o progreso del proceso carcinogénico. Sin embargo, los ensayos experimentales, moleculares y celulares son esenciales para calibrar estos modelos computacionales, verificando las hipótesis generadas *in silico* y revelando, *in vivo*, efectos no previstos.

En este trabajo, se validó experimentalmente las predicciones del modelo de inestabilidad genómica propuesto por Suescum en el 2020, donde se teoriza que la regulación de la proteína PLK1 sobre los genes *AURK*, *INCENP*, *KIF2C* y *PTTG1* podría conducir a inestabilidad genómica a través de 3 circuitos: el complejo pasajero cromosómico, el complejo promotor de la anafase y el complejo del punto de control mitótico.

Para validar el modelo, se evaluaron mediante PCR en tiempo real los niveles de expresión de dichos genes en líneas celulares embrionarias de riñón (HEK 293) y tumorales derivadas de adenocarcinoma de colon (HT 29). Los resultados mostraron diferencias en los patrones de expresión que coinciden con las predicciones del modelo matemático y con interacciones reportadas previamente entre *PLK1* y los genes evaluados. Sin embargo, la alta variabilidad experimental entre réplicas impide confirmar estas diferencias estadísticamente, por lo que se requieren mejoras metodológicas para aumentar la reproducibilidad y reducir la variabilidad, lo cual fortalecería la posibilidad de asociar las diferencias detectadas con procesos tumorales. Una optimización de los protocolos experimentales y un aumento en el número de réplicas biológicas son esenciales para validar de forma más sólida el modelo matemático propuesto inicialmente.

Palabras clave: Cáncer, qPCR, Inestabilidad genómica, modelos matemáticos y líneas celulares.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease characterized by the loss of cellular identity in a tissue context, initially leading to uncontrolled proliferation of transformed cells. Due to the high complexity and the large number of factors that can trigger the loss of cellular identity, subsequently, leading to tumor formation, new approaches have been sought in recent years to simplify the study of cellular events that can initiate tumorigenesis. Mathematical models are one of such alternatives that enable the study of complementary mechanisms derived from interaction networks involved in carcinogenesis. However, experimental assays remain essential to calibrate these computational models, verifying the hypotheses generated *in silico* and revealing, *in vivo*, unforeseen effects.

In this study, the predictions of the genomic instability model proposed by Suescum in 2020 were experimentally validated. The model theorizes that the regulation of the PLK1 protein on the *AURK*, *INCENP*, *KIF2C*, and *PTTG1* genes could lead to genomic instability through three circuits: the chromosomal passenger, the anaphase-promoting, and the mitotic checkpoint complexes.

To validate the model, the expression levels of these genes were assessed implementing real-time PCR assays in embryonal (HEK 293) and colon adenocarcinoma-derived cell lines (HT 29). The results showed differences in expression patterns that corroborate the mathematical model predictions, highlighting previously reported interactions between *PLK1* and the evaluated genes. However, the high experimental variability among replicates avoids statistical confirmation of found differences, suggesting the need of methodological improvements to enhance reproducibility and reduce variability. This optimization would strength the ability to associate the detected differences with the carcinogenic processes.

Keywords: Cancer, qPCR, genomic instability, mathematical models and cell lines.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la pérdida de la identidad celular en un contexto tisular que inicialmente conduce a una proliferación descontrolada de las células transformadas. Estas células transformadas, conocidas como células cancerosas, presentan variaciones en su funcionamiento derivados de alteraciones genómicas y epigenómicas que producen cambios fenotípicos que alteran el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, desencadenando en la formación de tumores (Ohshima, K., et al. 20019). Los tumores son tejidos complejos que cuentan con una alta variabilidad celular y una intrincada red de interacciones celulares que les permiten alterar el funcionamiento del órgano en el que se encuentran comprometiendo en su evolución el equilibrio fisiológico del organismo que los porta (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000, 2011).

La carcinogénesis es un proceso complejo y la descripción a detalle de todos los posibles pasos que conllevan a que una célula normal se convierta en una célula maligna ha requerido varias décadas de investigación (Ohshima, K., et al. 2019). A lo largo de los años, investigaciones en el campo de la oncología han revelado diversos procesos biológicos y moleculares implicados en el desarrollo y la progresión del cáncer, es así como se han descrito un conjunto de características que comparten los diversos tipos de cánceres conocidas como las marcas distintivas del cáncer que han contribuido a la comprensión integral del fenómeno carcinogénico (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

Hasta el 2011 Hanahan y Weinberg habían descrito diez marcas distintivas del cáncer, las cuales son: (i) Autonomía en señales de crecimiento, (ii) evasión de las señales anti crecimiento, (iii) capacidad para evitar la apoptosis, (iv) potencial replicativo ilimitado, (v) facultad para formar nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (angiogénesis), (vi) la habilidad para invadir otros tejidos del cuerpo y (vii) hacer metástasis (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000), (viii) la capacidad para modificar el metabolismo celular, (ix) evasión de la respuesta inmune, (x) inestabilidad genómica e inflamación promotora de tumores (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011). Más recientemente los autores han propuesto nuevas características para ser agregadas a esta lista: (i) desbloqueo de la plasticidad fenotípica, (ii) reprogramación epigenética no mutacional, (iii) microbiomas polimórficos y (iv) células senescentes (Hanahan, D. 2022). Todas estas alteraciones le confieren a las células transformadas la capacidad de independizarse del control celular definido por su entorno de desarrollo, alterando las funciones fisiológicas de los tejidos que las albergan (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000), sin embargo, es importante resaltar que el proceso de tumorogénesis no se puede comprender como un proceso unidireccional que sigue un número determinado de pasos hasta llegar a un estadio final, en cambio, el proceso de transformación neoplásica debe entenderse como parte de todo un conjunto de eventos moleculares, asincrónicos en tiempo y espacio, cuyo proceso de transformación es altamente dependiente del microambiente celular y la actividad de las células estromales (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

El poder describir y comprender las alteraciones que dan lugar a la formación de tumores ha llevado décadas de investigación por la gran complejidad que implica describir el detalle de todas las dinámicas moleculares, celulares y fisiológicas involucradas, es por esto que los modelos matemáticos representan una alternativa novedosa para estudiar desde una perspectiva integral todas las diferentes dinámicas que conllevan al desarrollo del cáncer, en

un ambiente computacional que permite controlar y especificar variables de una manera puntual, imposible de hacerse en un ambiente experimental. La formalización de los ciclos y dinámicas moleculares en ecuaciones diferenciales puede proporcionar información sobre el crecimiento del tumor, la progresión y la respuesta a las terapias desde una perspectiva predictiva. Así mismo, los modelos pueden integrar datos a múltiples escalas, desde la molécula hasta la celular y tisular, en un marco de biología de sistemas, lo que ayuda a comprender comportamientos emergentes del cáncer que surgen de interacciones complejas (Brady, R., & Enderling, H. 2019).

Los modelos matemáticos son herramientas poderosas para estudiar la biología del cáncer, sin embargo, las simplificaciones hechas en estos modelos implican que sus resultados deben confirmarse con experimentos de laboratorio. Las pruebas moleculares, celulares o fisiológicas son esenciales para calibrar y entrenar los modelos, revelando efectos emergentes no capturados en las simulaciones *in silico*, también permitiendo descartar predicciones erróneas y evaluar la relevancia clínica de las optimizaciones de tratamientos sugeridas por las simulaciones computacionales (Brady, R., & Enderling, H. 2019). Por esta razón en el presente trabajo de grado se busca validar experimentalmente las predicciones hechas en el modelo matemático de inestabilidad genómica, postulado por Suescum y colaboradores, a través de la cuantificación de marcadores de inestabilidad específicos, para establecer comparaciones puntuales entre las predicciones realizadas *in silico* y los resultados experimentales obtenidos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Las marcas distintivas del cáncer

En los tejidos sanos se requieren señales de crecimiento para mantener la homeostasis y un correcto funcionamiento tisular, repoblando los tejidos con actividad proliferativa a partir de la generación de nuevas células funcionales. Las señales de crecimiento, producidas en el exterior de la célula, se acoplan a distintas clases de moléculas señaladoras, como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de interacción célula-célula para guiar finalmente la progresión del ciclo. Así, las células puedan pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activa (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000, 2011). Las señales que dan inicio al ciclo celular son transmitidas por factores de crecimiento que se unen a receptores en la superficie de las células, los cuales suelen contener dominios de tirosina quinasa y por ende se denominan receptores con actividad tirosina-quinasa (RTKs) (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011). Estos receptores tienen un rol fundamental en una amplia variedad de funciones como el metabolismo, la comunicación entre células, el crecimiento y el ciclo celular, es así como la alteración en las señales disparadas por la activación de los RTKs se asocia al desarrollo de diversos tipos de enfermedades en humanos, entre ellas el cáncer (Du, Z., & Lovly, C. M. 2018). Los RTKs están sobreexpresados en muchos cánceres, lo cual genera que las células tumorales sean hiper responsivas a niveles fisiológicamente normales de factores de crecimiento (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000), incluso, se ha observado la capacidad adquirida de ciertas células cancerosas para

comunicarse con las células normales circundantes y así nutrirse de los factores de crecimiento necesarios para estas células (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

La regulación de las señales antiproliferativas, que mantienen a las células en un estado quiescente, es otro de los mecanismos que mantienen la homeostasis de tejidos sanos. Estas señales se reciben a través de receptores de membrana celular acoplados a circuitos de señalización intracelular y pueden bloquear la proliferación celular de dos maneras: (i) induciendo la entrada a un estado quiescente donde la célula permanece sin dividirse hasta que se reactiven las señales específicas de división celular o (ii) estados postmitóticos de diferenciación que hacen que la célula ya diferenciada salga permanentemente del ciclo celular (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000). Las células cancerosas pueden evadir las señales antiproliferativas debido a alteraciones estructurales y funcionales en las diferentes rutas metabólicas y proteínas efectoras que se encargan de regular el ciclo celular; un ejemplo de esto es la pérdida de expresión por delección o metilación del gen RB1 que codifica para la proteína del retinoblastoma o pRB, cuya alteración se ha visto relacionada con la aparición de diferentes tipos de tumores (Di Fiore, R., D'Anneo, A., et al 2013) (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000).

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que ocurre de manera natural en organismos multicelulares, es un proceso altamente regulado y organizado que elimina células dañadas, infectadas o innecesarias, se caracteriza por cambios morfológicos, incluyendo la reducción de tamaño de la célula, la formación de vesículas en la membrana, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, esto es seguido por la descomposición de la célula en pequeños cuerpos apoptóticos que son engullidos por los fagocitos y eliminados sin inducir inflamación. La apoptosis desempeña roles cruciales en el desarrollo, la homeostasis celular y la función del sistema inmunológico (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011). La maquinaria apoptótica está controlada por diversas vías de señalización y proteínas reguladoras que integran señales internas y externas para determinar el destino celular; las dos vías principales que regulan la apoptosis son la vía extrínseca, mediada por la activación de receptores de muerte en la superficie celular, y la vía intrínseca, regulada por la familia de proteínas Bcl-2 que controlan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Ambas vías convergen en la activación de caspasas ejecutoras que fragmentan los componentes celulares causando los cambios morfológicos de la apoptosis (Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. 2020).

La resistencia adquirida a la apoptosis es común en las células cancerosas y puede lograrse a través de diversas alteraciones, como la inactivación del gen supresor de tumores p53, lo que impide la síntesis de la respectiva proteína cuya función es detectar daños en el material genético de las células y desencadenar la maquinaria apoptótica. Otro mecanismo que permite a las células generar resistencia a la apoptosis es la activación de la vía de señalización PI3 quinasa-AKT/PKB, que promueve la supervivencia celular y puede ser activada por señales intracelulares, factores extracelulares, o por la pérdida de supresores tumorales como el gen pTEN, que se encarga de atenuar la señal AKT de supervivencia celular y así evadir la apoptosis (Song, M., Salmena, L., & Pandolfi, P. 2012; Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000). Las células cancerosas también pueden reducir la señalización de los receptores de muerte o la función de las caspasas para debilitar la vía apoptótica extrínseca, aumentando la expresión de

proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que se unen a las caspasas (Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. 2020).

Ahora bien, estos tres eventos pueden generar un aumento en la tasa de reproducción celular, pero por si solos no son suficientes para que se pueda formar un macro tumor, ya que como lo han demostrado diversos estudios, las células normales poseen un potencial de crecimiento limitado, mientras que las células extraídas de tumores no parecen tener esta limitación en su replicación (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000). Los tejidos fisiológicamente normales regulan cuidadosamente la proliferación celular para mantener la homeostasis, imponiendo barreras como la senescencia y la fase de crisis, donde la mayoría de las células en cultivo mueren, estas dos barreras limitan el potencial replicativo de las células. Los telómeros, que son secuencias repetitivas que protegen los extremos de los cromosomas, también desempeñan un papel central en la regulación de la vida reproductiva, con cada división celular ya que éstos se acortan progresivamente hasta que pierden sus funciones protectoras, lo que lleva a la muerte celular. Las células cancerosas adquieren la capacidad de mantener el ADN telomérico a través del aumento de la expresión de la enzima telomerasa, que extiende el ADN telomérico y permite a las células evitar la senescencia y la crisis replicativa, por lo tanto, el mantenimiento de los telómeros es crucial para habilitar el potencial proliferativo ilimitado de las células cancerosas. Aunque la activación de la telomerasa fue vista originalmente como un mecanismo exclusivamente para la elongación de los telómeros, evidencia emergente sugiere que tiene funciones no canónicas adicionales que promueven la proliferación y supervivencia celular (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos, es una característica fundamental del cáncer. Los tumores requieren nutrientes, oxígeno y eliminar desechos metabólicos, y la angiogénesis posibilita estas funciones al generar un suministro sanguíneo continuo. A diferencia de los tejidos normales, donde la angiogénesis se activa de manera transitoria, los tumores adquieren la capacidad de mantener la angiogénesis en un proceso llamado "interruptor angiogénico", este interruptor está regulado por un equilibrio de factores pro angiogénicos como el factor de crecimiento VEGF y factores antiangiogénicos como el trombospodina-1. El VEGF promueve la angiogénesis al unirse a receptores en las células endoteliales, mientras que el trombospodina-1 inhibe la estimulación de las células endoteliales. La vascularización del tumor generada por la angiogénesis es altamente anormal, con ramificaciones excesiva y perfusión deficiente. El interruptor angiogénico ocurre temprano durante el desarrollo del tumor, permitiendo la transición del carcinoma *in situ* al carcinoma invasivo. Los tumores muestran una heterogeneidad significativa en la intensidad de la angiogénesis, que va desde fenotipos hipo vasculares hasta altamente vascularizados (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

La propagación de las células cancerosas desde el tumor primario a sitios distantes es una característica fundamental del cáncer y una de las principales causas de mortalidad por esta enfermedad. La metástasis es un proceso multifásico que involucra la invasión en los tejidos circundantes, la intravasación en los vasos sanguíneos, la supervivencia en la circulación, la extravasación en sitios distantes, la formación de micrometástasis y, finalmente, el crecimiento de metástasis macroscópicas. La activación del programa de transición epitelio mesenquimática (EMT) promueve la metástasis al permitir la invasión, la resistencia a la apoptosis y la diseminación de las células transformadas. Este programa molecular está

regulado por factores de transcripción como Snail, Slug y Twist, que están involucrados en el desarrollo embrionario y tienen la capacidad de cambiar la morfología celular (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011) (Smith, B. N., & Bhowmick, N. A. 2016).

La hibridación genómica comparativa revela anomalías generalizadas en el número de copias de genes en las células cancerosas, lo que indica pérdida de integridad del genoma. Desde esta perspectiva, la inestabilidad genómica se refiere a la alteración de la estructura y función del material genético en las células y puede manifestarse de diversas formas, incluyendo cambios en el número de cromosomas (aneuploidía), mutaciones en genes específicos y modificaciones en el ADN, como deleciones, duplicaciones o reordenamientos cromosómicos. Estas alteraciones genéticas pueden afectar la capacidad de las células para regular su ciclo celular, reparar daños en el ADN y responder a señales de muerte celular programada, lo que lleva a una proliferación descontrolada y a la formación de tumores (Sansregret, L., & Swanton, C. 2017; Wenzel, E. S., & Singh, A. T. 2018). La fidelidad de los sistemas de replicación y reparación del ADN mantiene bajas tasas de mutación, sin embargo, las células cancerosas desarrollan una sucesión de mutaciones a través de una mayor sensibilidad a agentes mutagénicos o a la alteración de componentes de la maquinaria de mantenimiento del ADN. Las deficiencias resultantes permiten tasas de mutación altas y habilitan la generación de aberraciones cromosómicas aumentadas (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

La inflamación protumoral es una característica habilitadora del cáncer. Los sitios de inflamación crónica a menudo están asociados con la formación de tumores, lo que sugiere que las células implicadas en procesos inflamatorios pueden promover involuntariamente la tumorigénesis. Las células inmunitarias que normalmente ayudan a combatir infecciones y sanar heridas pueden, en cambio, contribuir a la progresión del cáncer, por ejemplo, los macrófagos asociados al tumor secretan factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, así mismo, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos que estimulan la formación anómala de vasos sanguíneos y enzimas que modifican la matriz extracelular, facilitan la angiogénesis, la invasión y procesos de metástasis. Otras células inflamatorias, como los mastocitos y los neutrófilos, también ayudan a los tumores a reclutar nuevos vasos sanguíneos e invadir tejidos. Así, las células inflamatorias crean un microambiente que promueve el tumor. Además, estas células pueden liberar productos químicos mutagénicos, como especies reactivas de oxígeno, que aceleran la evolución genética de las células cancerosas. Normalmente la inflamación se desarrolla temprano durante la progresión del tumor y puede contribuir al crecimiento de neoplasias incipientes hacia cánceres desarrollados (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

La reprogramación del metabolismo energético es una característica del cáncer que sostiene el crecimiento celular continuo. Las células normales procesan la glucosa a través de la glucólisis y luego a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial, la vía más eficiente para producir ATP, pero las células cancerosas exhiben una glicólisis aeróbica aumentada, llamada el efecto Warburg, donde convierten la glucosa a lactato incluso en presencia de oxígeno, esto es menos eficiente para la producción de ATP, así que las células cancerosas sobreexpresan transportadores de glucosa y enzimas glucolíticos para intensificar la captación de glucosa (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011). Aunque se han identificado muchas alteraciones metabólicas específicas del cáncer mediante estudios de líneas celulares

cancerosas y modelos de ratones, los tumores humanos muestran una notable heterogeneidad en sus fenotipos metabólicos, y como resultado, no han surgido características metabólicas fijas o universales que puedan ser explotadas de manera efectiva para la terapia en todos los tipos de cáncer (Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. 2020).

La capacidad de las células cancerosas para evadir el ataque inmunológico es otra característica emergente del cáncer. El sistema inmunológico puede reconocer y eliminar las células tumorales mediante un proceso llamado vigilancia inmunológica, no obstante, los tumores desarrollan estrategias para evitar la destrucción inmunológica en un proceso denominado inmunoedición. Por ejemplo, los tumores desactivan las células T citotóxicas y las células denominadas *natural killers* a través de factores inmunosupresores como el TGF- β . Los tumores también reclutan células T reguladoras y células supresoras derivadas de la médula ósea que inhiben la inmunidad contra el tumor. Los datos clínicos muestran que ciertos tipos de cánceres presentan una mayor infiltración de linfocitos citotóxicos y un mejor pronóstico (Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011).

El desbloqueo de la plasticidad fenotípica se refiere a la capacidad de las células cancerosas para alterar su estado de diferenciación, permitiéndoles evadir los mecanismos de supresión del crecimiento que normalmente están asociados con la diferenciación terminal. Las células cancerosas pueden utilizar diversas formas de diferenciación alterada, incluida la desdiferenciación de tipos celulares maduros hacia estados similares a los de células progenitoras, bloquear la diferenciación para permanecer en un estado proliferativo no diferenciado, e incluso transdiferenciarse en un linaje celular completamente diferente. Estos procesos permiten que las células cancerosas regresen a un estado similar al de las células madre, eviten la senescencia inducida por la diferenciación o la muerte celular, y adquieran fenotipos celulares más adecuados para la supervivencia y expansión en el microentorno tumoral. La capacidad de desbloquear la plasticidad fenotípica parece ser una capacidad adquirida clave para la patogénesis del cáncer. Las evidencias sugieren que opera ampliamente en muchos tipos de cáncer durante la formación de tumores primarios, la metástasis y la resistencia a la terapia (Hanahan, D. 2022).

La reprogramación epigenética no mutacional son cambios asociados al cáncer en los patrones de expresión génica que son controlados por mecanismos epigenéticos en lugar de mutaciones en la secuencia de ADN. Los principales mecanismos epigenéticos involucrados son la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la remodelación de la cromatina y los ARN no codificantes. Estos procesos regulan la expresión génica controlando la estructura y accesibilidad de la cromatina sin alterar el código de ADN subyacente (Hanahan, D. 2022).

En las células cancerosas, la regulación epigenética anormal puede llevar a la activación transcripcional de oncogenes y al silenciamiento de genes supresores de tumores, imitando los efectos de las mutaciones que promueven el cáncer, sin embargo, estos cambios en la expresión génica son reversibles y están regulados por enzimas que agregan, eliminan o se unen a marcas epigenéticas en lugar de cambios fijos en la secuencia de ADN. La evidencia sugiere que la reprogramación epigenética no mutacional contribuye a múltiples capacidades fundamentales del cáncer, incluida la proliferación sostenida, la resistencia a la muerte

celular, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, la evasión de la destrucción inmunológica y la plasticidad celular (Hanahan, D. 2022).

Los microbiomas polimórficos se refieren a la composición variable de comunidades microbianas, especialmente bacterias, que están asociadas con diferentes tejidos en el cuerpo humano. Cada persona alberga una firma de microbioma distintiva que puede modular el riesgo y la progresión del cáncer. Es el microbioma intestinal el que ha sido el más estudiado en relación con el cáncer. Las diferencias en las poblaciones del microbioma intestinal entre individuos, denominadas disbiosis, pueden influir en procesos involucrados en el desarrollo del cáncer colorrectal, como la inflamación, las respuestas inmunitarias, la genotoxicidad y el metabolismo. Estudios hechos sobre el trasplante de microbioma fecal en ratones indican que ciertas especies bacterianas parecen promover el crecimiento tumoral, mientras que otras son protectoras (Hanahan, D. 2022). De igual manera, sitios del cuerpo como la cavidad oral, los pulmones, la piel y el tracto genitourinario también albergan microbiomas específicos del tejido que están cada vez más vinculados a los cánceres en esos órganos. Las bacterias residentes pueden modular los microambientes inmunitarios locales, en particular el equilibrio entre la inmunidad pro y antitumoral. También se han detectado bacterias intratumorales que conforman un microbioma tumoral en diversos tipos de cáncer y parecen correlacionarse con características como la metástasis. En modelos de ratones, la eliminación de bacterias con antibióticos afecta el crecimiento tumoral, esto indica que el microbioma tumoral influye directamente en los fenotipos del cáncer (Hanahan, D. 2022).

La senescencia celular se refiere a una forma estable de detención del ciclo celular que puede ser desencadenada por diversos tipos de estrés y desequilibrios en las señales celulares. Las células senescentes siguen siendo metabólicamente activas, pero son incapaces de proliferar. Exhiben un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), que implica la liberación de moléculas bioactivas como citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas.

Las células senescentes se acumulan en los tejidos durante el envejecimiento y en tejidos que se asocian a patologías específicas. Tradicionalmente, se pensaba que la senescencia era un mecanismo supresor de tumores. Sin embargo, la evidencia emergente indica que las células senescentes también pueden promover fenotipos cancerígenos. Algunos efectos de la senescencia parecen ser mediados por el SASP, pero las células senescentes también influyen en la progresión tumoral a través de la competencia celular, efectos metabólicos y remodelación del tejido. Es importante destacar que, en algunos contextos, las células cancerígenas senescentes pueden reanudar la proliferación, contribuyendo al crecimiento del tumor después de la terapia.

2.2 Polo-like Kinase 1

Polo-like kinase 1 (PLK1) es una enzima quinasa que desempeña un papel crucial en la regulación del ciclo y la división celular. Está involucrada en diversas etapas del ciclo celular, incluyendo la entrada en la mitosis, la separación de cromosomas y la citocinesis. PLK1 actúa como un regulador maestro de la progresión del ciclo celular, asegurando que cada fase se complete correctamente antes de avanzar a la siguiente. Varios estudios han sugerido una

relación entre PLK1 y la inestabilidad genómica debido a su papel esencial en la segregación precisa de los cromosomas durante la mitosis, durante esta etapa, PLK1 asegura que los cromosomas se separen correctamente y se distribuyan equitativamente en las células hijas. Si la actividad de PLK1 se ve comprometida, pueden ocurrir errores en la segregación cromosómica, lo que lleva a una aneuploidía y a la generación de células hijas con un número anormal de cromosomas (Gheghiani, L., & Zheng, F. 2023).

Además de su papel en la segregación cromosómica, PLK1 también participa en la respuesta a daños y en los procesos de reparación del ADN, cuando se producen daños en el material genético, PLK1 se activa y desencadena una serie de eventos que promueven la reparación del ADN dañado. Si la función de PLK1 se ve afectada, la capacidad de la célula para reparar eficientemente el ADN dañado disminuye, lo que puede conducir a la acumulación de mutaciones que derivan en la aparición de fenotipos asociados a la inestabilidad genómica (Gheghiani, L., & Zheng, F. 2023).

En el contexto del cáncer, PLK1 ha sido objeto de numerosos estudios debido a su sobreexpresión o hiperactividad en varios tipos de tumores, así como su asociación con la proliferación celular descontrolada y la progresión tumoral; igualmente, se ha observado que PLK1 está implicada en la regulación de genes y proteínas clave en el ciclo celular, como p53 y p21, que son importantes para la respuesta al daño en el ADN y para la supresión del crecimiento celular (Liu, Z., Sun, Q., & Wang, X. 2017). *PLK1* también se ha relacionado con la resistencia a la terapia y la supervivencia celular de las células cancerosas; a su vez se ha demostrado que la inhibición de *PLK1* resulta en la detención del ciclo celular, la apoptosis y la disminución de la capacidad de crecimiento de las células cancerosas in vitro y en modelos animales. Por lo tanto, los inhibidores de *PLK1* han surgido como una estrategia prometedora en el campo de la terapia del cáncer y están siendo evaluados en ensayos clínicos. (Liu, Z., Sun, Q., & Wang, X. 2017).

Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el gen *PLK1* podría inducir o promover eventos de inestabilidad genómica aún no están del todo claros. Esto ha motivado investigaciones como la realizada por Suescum en el 2020, donde se reconstruyó y se modeló de manera detallada la red de regulación de *PLK1* con el fin de esclarecer cuales son aquellos procesos con el potencial de desencadenar un aumento en la aparición de mutaciones y errores durante el ciclo celular. En este estudio se identificaron y modelaron los principales procesos celulares en los que la desregulación de la proteína PLK1 puede conducir a procesos de inestabilidad genómica, lo que permitió la identificación de los tres circuitos de interacción proteína-proteína que representan los mecanismos con el potencial para inducir dichos eventos de inestabilidad genética. Según el modelo propuesto los tres circuitos son: la “vía de regulación de AURKB y el complejo pasajero cromosómico” y “la unión de los microtúbulos a los cromosomas, junto con la regulación del punto de control mitótico”, sobre los que PLK1 mostró una regulación positiva debido a la acción activadora y estabilizadora de la quinasa

PLK1 sobre las proteínas de ambos circuitos. El tercer circuito es “la transición a anafase y la actividad de ESPL1”, donde se determinó que PLK1 tiene una actividad inhibitoria sobre las proteínas involucradas. La identificación de estos procesos también permitió identificar los genes AURK, INCENP, KIF2C, PLK1 y PTTG1, los cuales codifican las principales proteínas involucradas en el funcionamiento de los circuitos de interacción proteína-proteína señalados anteriormente.

2.3 HEK-293

HEK293 es una línea celular derivada de células embrionarias humanas renales (Human Embryonic Kidney 293) ampliamente utilizada en la investigación en biología celular y en el campo de la oncología debido a su fenotipo bien caracterizado, su capacidad de crecimiento rápido en cultivo y por su alta capacidad de transfección y expresión de genes exógenos, lo que la convierte en una herramienta valiosa para la producción de proteínas recombinantes y estudios de expresión génica (Stepanenko, A., Dmitrenko, V. 2015).

En cuanto a su cariotipo, un estudio realizado por Stepanenko y Dmitrenko en el 2015 reveló que la línea celular HEK293 presenta una aneuploidía compleja, lo que significa que tiene un número anormal de cromosomas y alteraciones estructurales en ellos. Estas características genéticas pueden influir en el comportamiento y las propiedades biológicas de la línea celular.

Es importante destacar que, aunque la línea celular HEK293 se originó a partir de células renales embrionarias, no es un modelo celular normal y no representa las características típicas de las células renales normales. Por lo tanto, se utiliza principalmente como una herramienta de investigación en lugar de un modelo celular para estudiar enfermedades renales específicas. (Stepanenko, A., Dmitrenko, V. 2015).

2.4 HT-29

HT-29 es una línea celular aislada a partir de una muestra de tejido tumoral de un adenocarcinoma de colon primario de un paciente humano, y se caracteriza por su capacidad para crecer de manera continua en cultivo y mantener características similares a las células cancerosas presentes en los tumores de colon. Esta línea celular se ha utilizado ampliamente como un modelo in vitro para estudiar la biología del cáncer de colon y evaluar la eficacia de nuevas terapias y tratamientos. El análisis detallado del cariotipo de la línea celular HT-29 reveló varias alteraciones estructurales, como cambios en el número de cromosomas, translocaciones y deleciones, que pueden tener implicaciones en la regulación de genes específicos y en la progresión del cáncer de colon. (Kawai, K., Viars, C., Arden, K., et al. 2002), (Hidalgo, C., Sánchez, B., Margolles, A., & Ruas, P. 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Los modelos deterministas de interacción molecular son abstracciones puntuales de la dinámica celular en donde los distintos tipos de interacción molecular que están presentes en un espacio celular son representados matemáticamente a partir de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE, por sus siglas en inglés). Estos modelos y las simulaciones derivadas de su ejecución son herramientas computacionales muy útiles para entender la dinámica de los sistemas biológicos complejos, sin embargo, estos modelos realizan una serie de suposiciones y simplificaciones que podrían no reflejar completamente la complejidad de los sistemas biológicos reales.

Aunque los modelos computacionales permiten generar predicciones sobre el comportamiento de las interacciones moleculares que se suceden en distintas condiciones, es crucial validar estas predicciones experimentalmente en el laboratorio para determinar su precisión y utilidad real, de lo contrario, se corre el riesgo de extraer conclusiones equivocadas sobre la función de ciertos genes o la respuesta celular frente a diferentes perturbaciones.

Los experimentos de laboratorio permiten medir las variaciones en los niveles de expresión génica, las interacciones entre proteínas y otros parámetros funcionales en células vivas. Estos datos experimentales son esenciales para validar los modelos computacionales y asegurar que capturen adecuadamente los mecanismos moleculares que controlan la expresión génica. Asimismo, los experimentos pueden revelar efectos emergentes en los sistemas biológicos que los modelos no son capaces de predecir y también permiten descartar predicciones incorrectas de los modelos que no concuerdan con el comportamiento real de las células.

En el presente trabajo de grado se pretende validar experimentalmente el modelo matemático de inestabilidad genómica, postulado por Suescum y colaboradores, a través de la cuantificación de marcadores de inestabilidad específicos, para establecer comparaciones puntuales entre las predicciones realizadas *in silico* y los resultados experimentales *in vitro* obtenidos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Validar experimentalmente el modelo matemático de inestabilidad genómica, postulado por Suescum y colaboradores en 2022, a través de la cuantificación de marcadores de inestabilidad específicos, para establecer comparaciones puntuales entre las predicciones realizadas *in silico* y los resultados experimentales *in vitro* obtenidos.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1. Implementar una plataforma experimental, por medio de la estandarización de las condiciones necesarias para el mantenimiento de líneas celulares específicas, que permita el uso de líneas celulares como modelos para el estudio de procesos biológicos específicos.

4.2.2. Establecer la relación de genes específicos con eventos de inestabilidad genómica, a través de la cuantificación de su expresión vía qPCR, para definir el comportamiento experimental de componentes clave del modelo computacional construido.

4.2.3. Contrastar los datos obtenidos experimentalmente *in vitro*, con los resultados de las simulaciones computacionales realizadas previamente por Suescum y colaboradores en 2022, vía comparaciones pareadas, para determinar la concordancia de los datos experimentales obtenidos con los derivados del modelo computacional ejecutado.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo celular.

Los cultivos utilizados experimentalmente son derivados de las líneas celulares HEK-293 (modelo de células embrionarias) y HT-29 (modelo de adenocarcinoma de colon). 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 100.000 células en 4 ml de medio, en flask de cultivo de 25 cm² y se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 80%, condición en la que se realizaban los pases necesarios para mantener la sobrevivencia y viabilidad del cultivo por el periodo de tiempo que duró la experimentación.

5.2 Lisado de células y extracción de ARN.

En el momento del pase del cultivo, 2 ml de las líneas celulares de interés, a una concentración de 50.000 células/ml fueron transferidos a platos de 6 pozos. Cada línea evaluada se cultivó independientemente, representando cada pozo del plato una réplica biológica. Después de dos días de haberse sembrado, el medio de cultivo fue retirado de cada pozo por aspiración y las células adheridas fueron limpiadas tres veces con PBS. El raspado de las células fue realizado por medio de policías y manteniendo las células a baja temperatura, haciendo el raspado sobre una bandeja con hielo. Para el rompimiento de las células, luego del raspado, a cada pozo se le agregó 350 µl del buffer de lisis (RNeasy Mini Kit-Qiagen®) y con una jeringa de insulina con calibre 31G se aspiró numerosas veces el lisado celular, para pasarlo por la aguja y así romper la membrana celular. Finalmente, el contenido celular se depositó en eppendorfs y se mantuvo a -80°C hasta los procedimientos de extracción de ARN.

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®) siguiendo las instrucciones procedimentales de la compañía. La cantidad y calidad del ARN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Para determinar la calidad del ARN extraído, se utilizó la relación 260 nm/230 nm en la absorbancia de la solución

de ácidos nucleicos, conservando las muestras que hubieran tenido, en la relación medida, valores entre 2 y 2.2. Finalmente, para cada muestra obtenida, el ARN fue disuelto a una concentración de 100 ng/ μ l.

5.4 Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Transcriptor Universal cDNA Master Mix (ROCHE®). A partir de 1 μ g de ARN obtenido, se realizó la conversión de éste a ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo de síntesis de la compañía que manufacturó el kit. La reacción de síntesis implementada se llevó a cabo de la siguiente manera: 5 minutos a 25°C, 10 minutos a 55°C y 5 minutos a 85°C. Finalmente, el ADNc sintetizado se diluyó a una concentración final de 2 ng/ μ l. Para cada línea celular se obtuvieron 6 réplicas biológicas a evaluar vía qPCR.

5.5 qPCR.

El protocolo qPCR se realizó siguiendo el método de cuantificación relativa implementando SYBR Green como fluoróforo de detección y utilizando el kit KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™. Para los experimentos se adicionaron 3 μ l de cDNA a una concentración de 2 ng/ μ l provenientes de las líneas celulares HEK293 y HT29, 5 μ l de mezcla de reacción (qPCR readyMix) y 1 μ l de cada primer a una concentración final de 2.5 μ M. Se evaluaron tres réplicas por cada réplica biológica de cada tratamiento analizado. Las réplicas biológicas tenidas en cuenta para los experimentos realizados fueron 3. El programa de amplificación contenía un período de incubación a 95 °C durante 600 segundos, 45 continuos ciclos de amplificación (95°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos y 72°C por 35 segundos). Finalmente, se realizó un análisis de denaturación (Tm Calling) para determinar la especificidad de los primers utilizados a través de los picos de denaturación generados. Por último, se utilizó el método de expresión relativa para calcular las diferencias en expresión en donde células HEK293 se contrastaron como células control contra las células HT-29. Para los patrones de comparación, la expresión de cada marcador clave para el modelo en las células HEK293 se relativizó a cero, y las diferencias en la expresión determinadas por el método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) se expresaron como variaciones con relación a este valor. Los genes actina y matpsy fueron utilizados como normalizadores. Los marcadores evaluados fueron:

Gen	QFW	QRV
PLK1	5'-TGACGGGGAGAGGAAGAAGACC-3'	5'-ATGGGGAGACGGGCAGGG-3'
AURKB	5'-ACCCTGCCCCAGCGAGTCC-3'	5'-CCCGAGCCAAGTACACGTTTCC-3'
INCENP	5'- CCGTCTTCCCCGAGTCCC -3'	5'- GGCACCTCAACATTCAGGAGCC -3'
KIF2C	5'-GCTTCGCATCACGGCTCAGGAGA-3'	5'-GACTTGCTCTTCCATCTCCTCGC-3'
PTTG1	5'-GGCTTTGGGAAGTGTCAACAGAGC-3'	5'-CTGGATAGGCATCATCTGAGGCAG-3'

Tabla 1. Secuencias FW y RV de los primers para cada uno de los marcadores amplificados.

6. RESULTADOS.

Se evaluaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) los niveles de expresión de los genes *AURKB*, *INCENP*, *KIF2C*, *PLK1* y *PTTG1*, para ello se analizaron 3 réplicas técnicas experimentales provenientes de 3 réplicas biológicas independientes por cada una de las dos líneas celulares evaluadas (HEK 293 y HT 29).

Al comparar los niveles de expresión relativa entre las muestras de ARN extraído de la línea celular HT29 con base en las muestras de ARN de la línea HEK 293, se encontró que la expresión del gen *AURK* en la línea HT29, disminuyó su expresión 0.40 veces en comparación con la línea HEK293, lo mismo ocurre para los genes *INCENP*, *KIF2C*, y *PLK1*, en donde se evidenció una disminución en su expresión de 0.48, 1.36 y 1.98 veces respectivamente, en contraste, para el marcador *PTTG1* se evidenció una sobreexpresión de más de tres veces en la línea HT29, al ser contrastada con las células HEK293 (gráfica 1). Aunque se detectaron patrones diferenciales de expresión génica entre las líneas celulares, la alta variabilidad entre réplicas experimentales en cada grupo impide establecer una diferencia estadísticamente significativa.

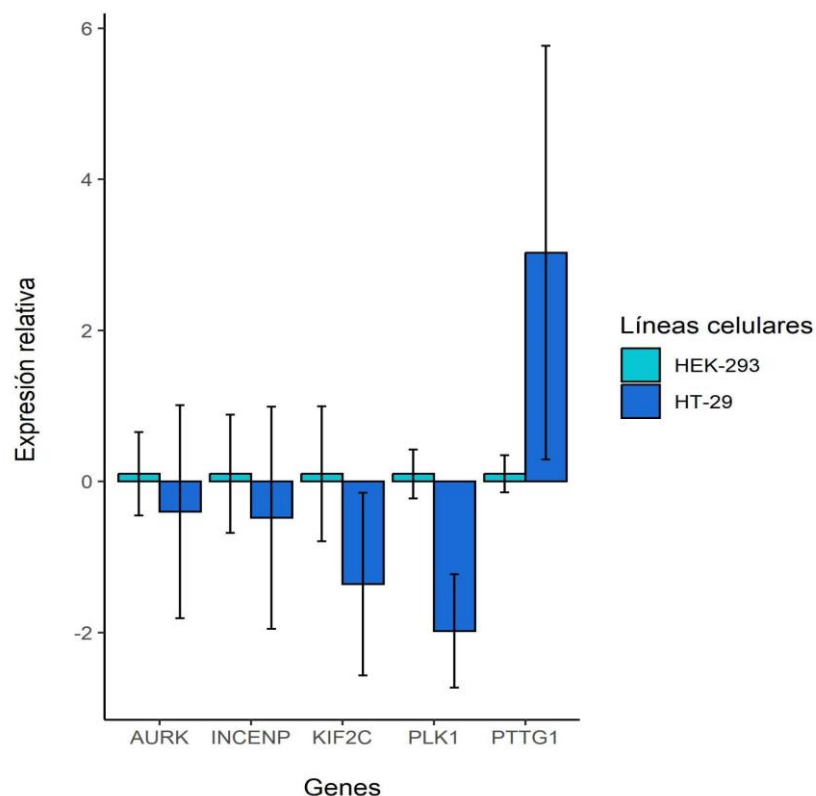


Fig. 1. Expresión relativa de los genes *AURK*, *INCENP*, *KIF2C*, *PLK1* y *PTTG1* en las muestras (n=3) extraídas de la línea celular HT-29 (color azul), comparados en base a los niveles de expresión de las muestras (n=3) extraídas de la línea celular HEK-293 (color verde). Los valores centrales de expresión fueron: *AURK* = -0.4, *INCENP* = -0.48, *KIF2C* = -1.36, *PLK1* = -1.98 y *PTTG1* = 3.03.

7. DISCUSIÓN.

El modelo de inestabilidad genómica, propuesto por Suescum y colaboradores en 2022 propone que los 3 principales circuitos génicos mediante los cuales la deregulación de PLK1 podría conducir a procesos de inestabilidad genómica son: el complejo pasajero cromosómico, el complejo promotor de la Anafase/Ciclosoma y el complejo del punto de control mitótico (figura 1). Según estos resultados computacionales, cuando exista una expresión de *PLK1*, esta expresión debe inducir una regulación positiva de sobre los genes *AURK*, *INCENP* y *KIF2C*, mientras que para el gen *PTTG1* se espera encontrar una regulación negativa. Dado que la línea celular HT29 presentó una subexpresión de *PLK1* en comparación a la línea HEK293, la regulación negativa sobre los genes *AURK*, *INCENP* y *KIF2C*, y en contraste, la regulación positiva para *PTTG1* refleja el comportamiento esperado descrito por Suescum y colaboradores.

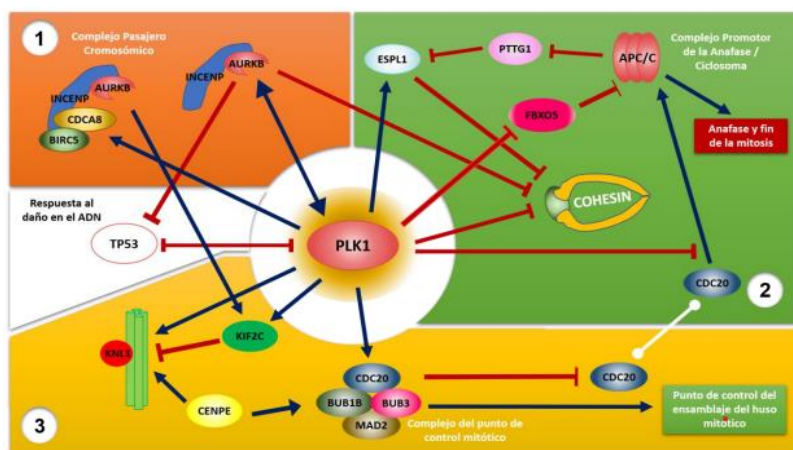


Fig. 2. Ruta de regulación e interacción del gen *PLK1* donde se muestran los 3 principales circuitos con potencial de generar eventos de inestabilidad genómica (Tomada de Suescum, J. 2021).

La vía de interacción con el complejo pasajero cromosómico o CPC (Chromosomal Passenger Complex) conformado por la quinasa Aurora B y sus proteínas reguladoras INCENP, Survivina y Borealina, es esencial para la correcta segregación de cromosomas durante la división celular. Un mal funcionamiento del CPC causado por la alteración en los niveles de expresión del gen *AURK* puede desencadenar una serie de errores en la segregación cromosómica, lo que conlleva a la formación de aneuploidías. Las quinasas *PLK1* y Aurora B actúan de forma coordinada para establecer conexiones entre los cinetocoros y los microtúbulos del huso mitótico durante la metafase, específicamente, *PLK1* fosforila a la subunidad reguladora de Aurora B llamada INCENP, esta fosforilación potencia la actividad quinasa de Aurora B en los cinetocoros, permitiéndole regular la estabilidad de las conexiones cinetocoro-microtúbulo. A su vez, Aurora B promueve el reclutamiento y activación de *PLK1* en los cinetocoros durante las primeras etapas de la mitosis, formando un bucle de retroalimentación positiva entre estas dos quinasas (Hindriksen, S., Meppelink, A., & Lens, S. M. 2015). La correlación que entre las quinasas Aurora B, *PLK1* e INCENP se ve reflejada en los patrones de expresión obtenidos en los análisis del presente estudio, donde se evidencia que los genes *PLK1*, *AURK* e *INCENP* se encuentran subexpresados en la muestra del cultivo derivado de células tumorales de colon (HT29), esta subexpresión podría desencadenar errores en las cascadas de señalización

que guían tanto procesos mitóticos cruciales como las vías de ensamblaje del huso mitótico o la duplicación del centrosoma, como procesos no mitóticos como lo son los puntos de control del ciclo celular, replicación del ADN y respuesta al daño del ADN (Joukov, V., & De Nicolo, A. 2018)

El Complejo promotor de la Anafase/Ciclosoma o APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) se encarga de regular la transición de la metafase a la anafase durante el ciclo celular. Junto con sus coactivadores *Cdh1* y *Cdc20* juega un papel crucial en la regulación del ciclo celular (Greil, C., Engelhardt, M., & Wäsch, R. 2022). *Cdh1* actúa como supresor de tumores y su disminución conduce a inestabilidad genómica, lo que conlleva al desarrollo de varios tipos de cáncer; por otra parte, *Cdc20* actúa como oncogén, ya que su sobreexpresión se ha visto relacionada con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Schrock, M. S., Stromberg, B. R., Scarberry, L., & Summers, M. K. 2020). Otro gen clave en el correcto proceso de mitosis es el gen *PTTG1*, el cual codifica la proteína PTTG1, una securina encargada de mantener unidas las cromátidas hermanas para evitar una segregación temprana; la máxima expresión de la securina se alcanza durante la fase S-G2, hasta que el punto de control mitótico se apaga y el APC/C induce la degradación de la proteína PTTG1 durante el final de la metafase (Romero Franco, A. 2016), durante el proceso de degradación de la securina también está involucrada la proteína PLK1 al promover la escisión de un subconjunto de sustratos de separasa en los centrosomas (Agircan, F. G., & Schiebel, E. 2014). Con base en las interacciones reportadas entre las proteínas PTTG1 y PLK1 se puede esperar que en caso de ocurrir una sobre expresión del gen *PLK1* pueda inducir una separación prematura de las cromátidas hermanas debido a la regulación negativa de PLK1 sobre la PTTG1.

El último de los tres circuitos de regulación; el complejo del punto del control mitótico se encarga de retrasar la segregación cromosómica inhibiendo la acción del APC/C hasta que la unión de los microtúbulos con los cinetocoros se haya completado (Izawa, D., & Pines, J. 2015). La proteína similar a la kinesina KIF2C, codificada por el gen *KIF2C*, es una proteína que hace parte de este complejo encargándose de regular la unión entre el cinetocoro y el huso mitótico, así como la segregación de los cromosomas (An, L., *et al* 2021). Las proteínas PLK1 y KIF2C, colaboran en la coordinación de eventos clave durante la mitosis. PLK1 puede aumentar la actividad de KIF2C mediante su fosforilación (Li, L. *et al.*, 2019), dando lugar a una regulación positiva. La interacción entre ambas puede ser crucial para la correcta progresión de la mitosis y la segregación adecuada de los cromosomas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la relación exacta y los mecanismos precisos de interacción entre PLK1 y KIF2C pueden variar según el contexto celular y los reguladores específicos del entorno mitótico.

8. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este estudio presentan una diferencia en los patrones de expresión génica de los genes *AURK*, *PLK1*, *INCENP*, *KIF2C* y *PTTG1*, entre las líneas celulares HEK293 y HT29, lo que coincide con los resultados propuestos por Suescum en el 2021 y concordando con las interacciones previamente reportadas en la literatura científica. Estos resultados obtenidos, sirven de base para futuras investigaciones donde se evalúe más a profundidad cada una de las interacciones que ocurre entre PLK1 y los demás genes evaluados y no evaluados en este estudio para establecer de una manera más detallada los procesos por

los cuales estas interacciones podrían causar eventos de inestabilidad genómica. Sin embargo, es necesario mejorar ciertos aspectos experimentales para incrementar la fiabilidad de los experimentos, así como para reducir su variabilidad inherente. La optimización de los protocolos experimentales, especialmente en etapas críticas como la extracción de ARN, la síntesis de cDNA y la qPCR, se presenta como aspectos de técnicos con un potencial de mejoría, que permitiría obtener mejores datos cuantitativos que deriven en la obtención de conclusiones sólidas. Asimismo, se sugiere aumentar el número de réplicas biológicas para fortalecer la robustez estadística de los resultados. La implementación de estas mejoras no solo contribuiría a validar de manera más concluyente las disparidades en los niveles de expresión génica entre las líneas celulares, sino que también fortalecería la posibilidad de asociar estas diferencias con procesos tumorales. La reproducibilidad mejorada y la reducción de la variabilidad son esenciales para garantizar la consistencia de los hallazgos y, por ende, la validez de las conclusiones. En conjunto, estas mejoras metodológicas proporcionarían una base más sólida para la comprensión de las implicaciones biológicas de las diferencias en la expresión génica entre las líneas celulares estudiadas.

9. REFERENCIAS.

Agircan, F. G., & Schiebel, E. Sensors at centrosomes reveal determinants of local separase activity. *PLoS genetics*, 10(10), e1004672. (2014).

An, L., Zhang, J., Feng, D., Zhao, Y., Ouyang, W., Shi, R., ... & Wang, H. KIF2C is a novel prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in endometrial cancer. *Stem Cells International*, 2021, 1-13. (2021).

Brady, R., & Enderling, H. Mathematical models of cancer: when to predict novel therapies, and when not to. *Bulletin of mathematical biology*, 81, 3722-3731. (2019).

Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417. (2020).

Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 228(8), 1676-1687. (2013).

Du, Z., & Lovly, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular cancer*, 17, 1-13. (2018).

Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487), eaaw5473. (2020).

Gheghiani, L., & Fu, Z. The dark side of PLK1: Implications for cancer and genomic instability. *Oncotarget*, 14, 657. (2023).

Greil, C., Engelhardt, M., & Wäsch, R. The role of the APC/C and its coactivators Cdh1 and Cdc20 in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 13, 941565. (2022).

Gutteridge, R. E. A., Ndiaye, M. A., Liu, X., & Ahmad, N. Plk1 inhibitors in cancer therapy: from laboratory to clinics. *Molecular cancer therapeutics*, 15(7), 1427-1435. (2016).

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

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674. (2011).

Hanahan, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46. (2022).

Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez García, B., Margolles Barros, A., & Ruas-Madiedo, P. Análisis en tiempo real del comportamiento de líneas celulares en presencia de compuestos bioactivos: interacción de componentes de *Bifidobacterium* con la línea intestinal HT29. (2012).

Hindriksen, S., Meppelink, A., & Lens, S. M. Functionality of the chromosomal passenger complex in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 43(1), 23-32. (2015).

Izawa, D., & Pines, J. The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature*, 517(7536), 631-634. (2015).

Joukov, V., & De Nicolo, A. Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis. *Science signaling*, 11(543), eaar4195. (2018).

Juárez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., Reyes, P., & Frías, S. Origen y consecuencias de la inestabilidad genómica Síndromes de inestabilidad cromosómica. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 42(42), 64-80. (2018).

Kawai, K., Viars, C., Arden, K., Tarin, D., Urquidi, V., & Goodison, S. Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 34(1), 1-8. (2002).

Liu, Z., Sun, Q., & Wang, X. PLK1, a potential target for cancer therapy. *Translational oncology*, 10(1), 22-32. (2017).

Li, L., Zhang, X., Tian, T., & Pang, L. Mathematical modelling the pathway of genomic instability in lung cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 14136. (2019).

malignant progression of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Science*, 110(12), 3821-3833.

Sansregret, L., & Swanton, C. The role of aneuploidy in cancer evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a028373. (2017).

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182-190. (2015).

Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(5), 283-296. (2012).

Ohshima, K., Fujiya, K., Nagashima, T., Ohnami, S., Hatakeyama, K., Urakami, K., ... & Yamaguchi, K. Driver gene alterations and activated signaling pathways toward. (2019).

Schrock, M. S., Stromberg, B. R., Scarberry, L., & Summers, M. K. APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 67, pp. 80-91). Academic Press. (2020).

Romero Franco, A. Capacidad transactivadora del gen pttg1 y su implicación en tumorigénesis. (2016).

Roy, PS., Saikia, BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. Jul-Sep;53(3):441-442. doi: 10.4103/0019-509X.200658. PMID: 28244479. (2016).

Wenzel, E. S., & Singh, A. T. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *in vivo*, 32(1), 1-5. (2018).