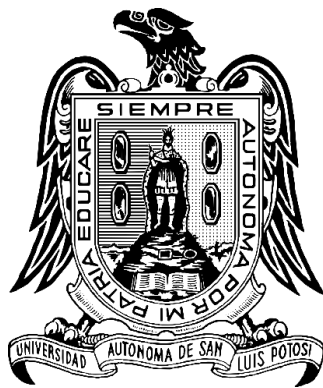




**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
Facultad de Ciencias  
Instituto de Física

Análisis de S100A9 en viabilidad, proliferación y migración dependiente de la  
expresión de RB en H1299

**Tesis que para obtener el grado de**  
Maestro en Ciencias Interdisciplinarias

**Presenta**

Lic. En Biofísica Nathaniel Atalasis Niño Ornelas

**Directores de Tesis:**

Dr. Jesús Hernández Monge  
Dra. Vanesa Olivares Illana

**Subcomité tutorial:**

Dr. Juan Rodrigo Vélez Cordero  
Dra. Mónica Raquel Calera Medina

San Luis Potosí, 28 de noviembre del 2025



A mi madre y a mi padre, que nunca me han dejado solo.

## Agradecimientos:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores de tesis, la Dra. Vanesa Olivares y el Dr. Jesús Hernández quienes, con gran experiencia, humildad y apoyo han guiado mi camino para la realización de este trabajo. Su guía no sólo me proporcionó claridad en mis metas, sino también motivación y confianza en momentos de duda. Sin ustedes no habría podido lograr esta meta.

A mis padres, a mis abuelos y a mi pareja, les agradezco profundamente por su amor incondicional y su apoyo constante cuando más lo necesité. Su fe y creencia en mi trabajo me ha mantenido con los pies en la tierra y me ha dado la fuerza necesaria para seguir persiguiendo mis sueños. Sin ustedes esto no habría sido posible.

Al Laboratorio de Interacciones Biomoleculares y Cáncer, al Laboratorio de Biomarcadores Moleculares y al Instituto de Física, por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente. El gran conocimiento, apoyo y humildad de todos los profesores de estos centros académico me impulsan a perseguir la investigación científica con la misma pasión que ellos.

A mis amigos, por su compañía y gran apoyo en los momentos más difíciles, por enseñarme a disfrutar y descansar tras largos días de trabajo. Ustedes fueron mi red de apoyo para cuando sentía que iba en caída. Su amistad, cariño y amor me ayudó a hacer de este proceso algo más llevadero y valioso.

Finalmente, agradezco a todos mis compañeros de trabajo y colaboradores que participaron en esta investigación. Su ayuda en mi capacitación, revisión de mi trabajo y sus comentarios enriquecieron este trabajo, siendo crucial para su realización.

A todos, gracias por acompañarme en mis sueños.

## Resumen:

El Retinoblastoma es un cáncer infantil causado por una mutación en el gen *RB1*, que desregula la actividad de la proteína RB, la cual está implicada en el correcto funcionamiento del ciclo celular. Mutaciones en *RB1* ocasionan la formación de retinomas y eventualmente, la proliferación descontrolada de células en la retina. La forma más común de detección de tumores de Retinoblastoma es mediante la presencia de un reflejo blanco en el ojo (leucocoria) y en algunos casos, el estrabismo. Esta forma de diagnóstico generalmente implica una detección tardía del cáncer y, por lo tanto, un aumento del riesgo de invasión incurable del ojo, pérdida de la vista o incluso la muerte.

Nuestro grupo de investigación observó un perfil proteómico en lágrimas de pacientes diagnosticados con Retinoblastoma que se comparó con un grupo control. Después de realizar análisis bioestadísticos y bioinformáticos, se detectó un grupo de proteínas estadísticamente relevantes que presentan una sobreexpresión en lágrimas de pacientes con Retinoblastoma. Estas proteínas se consideran potenciales biomarcadores y blancos terapéuticos, además de que su estudio nos puede ayudar a comprender los mecanismos subyacentes al desarrollo de Retinoblastoma u otros tipos de cáncer. Se seleccionó S100A9 de este grupo de proteínas desreguladas, la cual se ha reportado como potencial biomarcador diagnóstico y de pronóstico en diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama, cáncer gástrico, adenocarcinoma pulmonar, entre otro.

En este trabajo se analizó el papel de S100A9 en procesos de viabilidad, proliferación y migración celular en un modelo de carcinoma pulmonar H1299 con y sin la expresión de RB. Se diseñaron y validaron oligonucleótidos para amplificación y clonación del gen humano S100A9, confirmando su correcta inserción en un plásmido recombinante (pcDNA 3.1) y su expresión en células H1299 mediante Western Blot y qPCR. La transfección transitoria y la generación de líneas estables mostraron que la expresión de S100A9 se incrementa proporcionalmente a la cantidad de plásmido transfectado, con un efecto diferencial entre células WT y RB  $-/-$ . Los ensayos de viabilidad con tinción violeta revelaron una disminución significativa del número de colonias al aumentar los niveles de S100A9, mientras que la sobreexpresión favoreció la proliferación, confirmada por ensayos colorimétricos de resazurina. En los ensayos de migración, el aumento de S100A9 no modificó el comportamiento de células H1299 WT, pero la ausencia de RB potenció la migración celular.

En conjunto, los resultados sugieren que la sobreexpresión de S100A9, junto con la pérdida de RB, podría contribuir a un fenotipo maligno caracterizado por mayor proliferación y capacidad migratoria, lo que aporta evidencia al posible rol de S100A9 como un biomarcador y modulador de la oncogénesis en retinoblastoma.

## Contenido:

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introducción: .....                                                                                    | 10 |
| Cáncer.....                                                                                            | 10 |
| Ciclo Celular.....                                                                                     | 11 |
| Alteraciones Funcionales Adquiridas en Células Cancerosas: Proliferación, Migración y Viabilidad ..... | 12 |
| Proliferación .....                                                                                    | 13 |
| Migración.....                                                                                         | 13 |
| Viabilidad .....                                                                                       | 14 |
| Oncogénesis .....                                                                                      | 15 |
| Cáncer pediátrico .....                                                                                | 15 |
| Retinoblastoma.....                                                                                    | 16 |
| Epidemiología.....                                                                                     | 16 |
| <i>RB1</i> .....                                                                                       | 17 |
| Proteína RB.....                                                                                       | 17 |
| Clasificación de Retinoblastoma.....                                                                   | 18 |
| Diagnóstico .....                                                                                      | 18 |
| Tratamiento de Retinoblastoma.....                                                                     | 18 |
| Biomarcadores.....                                                                                     | 19 |
| S100A9 .....                                                                                           | 20 |
| S100A9 y la dediferenciación celular en cáncer .....                                                   | 20 |
| S100A9 y la proliferación celular en cáncer .....                                                      | 21 |
| S100A9 y la apoptosis en cáncer .....                                                                  | 23 |
| S100A9 en Retinoblastoma .....                                                                         | 24 |
| Hipótesis: .....                                                                                       | 28 |
| Objetivo general: .....                                                                                | 28 |
| Objetivos específicos:.....                                                                            | 28 |
| Metodología.....                                                                                       | 29 |
| Diseño de oligonucleótidos.....                                                                        | 29 |
| Producción de RNA .....                                                                                | 29 |
| Producción de cDNA .....                                                                               | 30 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| PCR punto final .....                                                        | 31 |
| RT-qPCR.....                                                                 | 32 |
| Electroforesis de DNA con Agarosa .....                                      | 34 |
| Digestión y desfosforilación de DNA.....                                     | 36 |
| Ligación de DNA en plásmido .....                                            | 37 |
| Transformación (DH5α).....                                                   | 37 |
| Proceso de selección de colonias para PCR y preparación de pre-cultivo ..... | 38 |
| SDS-PAGE .....                                                               | 39 |
| Western Blot .....                                                           | 40 |
| Viabilidad celular .....                                                     | 42 |
| Tinción con Cristal Violeta .....                                            | 42 |
| Ensayo de proliferación con Resazurin .....                                  | 43 |
| Ensayo “Wound Healing” .....                                                 | 44 |
| Resultados .....                                                             | 46 |
| Diseño de oligonucleótidos.....                                              | 46 |
| Amplificación del gen S100A9 .....                                           | 46 |
| Experimentos de expresión .....                                              | 49 |
| Experimento de qPCR.....                                                     | 56 |
| Experimentos de viabilidad (Tinción Violeta) .....                           | 57 |
| Ensayos de Proliferación (resazurin) .....                                   | 59 |
| Ensayos de Migración (Wound Healing) .....                                   | 61 |
| Discusión: .....                                                             | 65 |
| S100A9 y proliferación celular.....                                          | 65 |
| S100A9 y viabilidad celular .....                                            | 66 |
| S100A9 y migración celular .....                                             | 67 |
| Implicaciones moleculares y relevancia oncológica .....                      | 68 |
| Limitaciones y prospectivas .....                                            | 68 |
| Bibliografía .....                                                           | 70 |

## Índice de figuras:

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> S100A9 tiene actividad extracelular de activación de receptores RAGE (Receptor for Advance Glycation End Products), los cuales activan cascadas de señalización que activan la vía de las Quinasas MAPs y la vía de Nf-K $\beta$ , las cuales están involucradas en la diferenciación celular o en respuestas inflamatorias (Chang et al., 2016).....                                                                                     | 22 |
| <b>Figura 2:</b> Mecanismo de activación propuesto por Charan et al. de la transición MET activada por S100A9 mediante RAGE y las vías Akt-Gsk-3B-Snail (Charan et al., 2025). ....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Resumen de las interacciones intra y extracelulares en las que S100A9 está involucrada. Se remarca la ausencia de información de algunos de estos mecanismos (Li et al., 2009; Chang et al., 2016; Charan et al., 2025). ....                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| <b>Figura 4:</b> <i>Gel de Agarosa para observar gradiente de temperatura en amplificación por PCR de S100A9. El gen de S100A9 humano tiene una longitud de 576 pares de bases, el diseño de nuestros oligonucleótidos nos permite seleccionar sólo la región codificante de 489 pares de bases. Se incluye, además, la presencia de qGAPDH como control de integridad del cDNA. ....</i>                                                                  | 47 |
| <b>Figura 5:</b> Gel de Agarosa para observar el inserto de S100A9 digerido junto al plásmido completo sin digerir. R#: Plásmido superenrollado; D#: Digestión del Inserto. ....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 47 |
| <b>Figura 6:</b> Captura de la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), donde se muestra el nivel de identidad de cinco muestras diferentes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 48 |
| <b>Figura 7:</b> Captura de la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), donde se muestra la comparación entre una secuencia “Query” (el resultado de nuestra secuenciación) comparada con una secuencia Subject, que en este caso es el gen de Homo sapiens S100A9 calcium binding protein A9 (S100A9), mRNA, obtenida de la base de datos de GenBank del National Library of Medicine. Se muestra una coincidencia del 100% entre ambas..... | 49 |
| <b>Figura 8:</b> Western Blot para observar la expresión del plásmido de S100A9 en la línea celular H1299 WT. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 50 |
| <b>Figura 9:</b> Western Blot para observar la expresión del plásmido de S100A9 en la línea celular H1299 RB knockout. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 51 |
| <b>Figura 10:</b> Western Blot de la expresión de S100A9 en las líneas celulares H1299 WT y RB-/- . Se observa una mayor expresión entre las condiciones seleccionadas y, además, el resultado sugiere una mayor expresión de S100A9 basal en la línea celular deficiente de RB en comparación la WT. ....                                                                                                                                                 | 52 |
| <b>Figura 11:</b> Western Blot de S100A9 hecho a partir del medio RPMI completo, recuperado y concentrado después de incubar ambas líneas celulares con las respectivas concentraciones de S100A9 para un experimento de expresión. ....                                                                                                                                                                                                                   | 53 |
| <b>Figura 12:</b> Western blot S100A9 de líneas celulares estables con G418. Se muestra un control positivo de proteína de lágrima. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 54 |
| <b>Figura 13:</b> Western Blot de S100A9 hecho a partir de muestras tratadas con buffer de mayor concentración de DTT, para causar la separación del dímero de S100A9 y observar la migración de la proteína individual (peso relativo de S100A9: 14 kDa). ....                                                                                                                                                                                            | 55 |
| <b>Figura 14:</b> Gel de agarosa para ver la expresión del mRNA de S100A9 en ambas líneas celulares estables.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 56 |

|                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 15:</b> imagen representativa de las colonias teñidas con azul violeta. Se muestra el conteo, la línea celular (H1299 WT y RB -/-) y la condición a la que corresponden. ....                                              | 57 |
| <b>Figura 16:</b> Gráfica de la línea celular H1299 WT que muestra las diferencias entre el porcentaje de supervivencia en colonias en proporción a S100A9. ....                                                                     | 58 |
| <b>Figura 17:</b> Gráfica de la línea celular H1299 RB-/- que muestra las diferencias entre el porcentaje de supervivencia en colonias en proporción a S100A9. ....                                                                  | 58 |
| <b>Figura 18:</b> Gráfica de comparación de números de colonias entre condiciones de las líneas celulares H1299 WT y H1299 RB -/- . ....                                                                                             | 59 |
| <b>Figura 19:</b> Gráfica de la línea celular H1299 WT que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9. ....                                                                                    | 60 |
| <b>Figura 20:</b> Gráfica de la línea celular H1299 RB -/- que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9. ....                                                                                | 60 |
| <b>Figura 21:</b> Gráfica de las líneas celulares H1299 WT y H1299 RB -/- que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9. No existe relevancia significativa entre grupos. ....                | 61 |
| <b>Figura 22:</b> Imágenes representativas del proceso de migración celular de H1299 WT. Se muestran líneas rojas que delimitan el área estimada junto con el progreso en el tiempo de cada condición (Cx, 100 ng y 800 ng).....     | 62 |
| <b>Figura 23:</b> Imágenes representativas del proceso de migración celular de H1299 RB-/- . Se muestran líneas rojas que delimitan el área estimada junto con el progreso en el tiempo de cada condición (Cx, 100 ng y 800 ng)..... | 62 |
| <b>Figura 24:</b> Gráfica del porcentaje de disminución del área respecto al T=0 de la línea celular H1299 WT. ....                                                                                                                  | 63 |
| <b>Figura 25:</b> Gráfica del porcentaje de disminución del área respecto al T=0 de la línea celular H1299 RB-/-.....                                                                                                                | 63 |

## Introducción:

### Cáncer

Las evidencias más antiguas de cáncer en fósiles humanos datan de hace aproximadamente un millón de años, con un fragmento mandibular encontrado en el este de África, el cual se creía podía ser una evidencia de linfoma de Burkitt de un ejemplar pediátrico, debido a sus características dentales observadas (Stathopoulos, 1975). En estudios más recientes, se sugirió que podría representar un sarcoma osteogénico mandibular o un sarcoma no específico (Halperin, 2004).

Las primeras descripciones de una lesión compatible con el cáncer en la literatura médica se remontan al siglo IV a.C., realizadas por el médico griego Hipócrates, quien mencionó “lesiones ulcerosas crónicas, algunas veces endurecidas, que se desarrollan progresivamente y sin control” (Hipócrates, 1988; Salaverry, 2013). Es en esta época cuando también surge el origen etimológico de la palabra “cáncer”, ya que se describió que la lesión “se expandía por los tejidos semejando a las patas de un cangrejo” motivo por el cual se denominaron “καρκίος” (karkinos), dándole un segundo significado a la palabra griega para cangrejo. Esta palabra pasó al latín como “cancer”, conservando ambos significados: cangrejo y úlcera maligna (Salaverry, 2013).

Actualmente, el cáncer se define como una enfermedad multifactorial en la que una clona mutante de células comienza a prosperar a expensas de las células normales de su alrededor. Estas células presentan un conjunto de características que las definen: pueden reproducirse sin las restricciones normales de crecimiento y división celular, además de que tienen la capacidad de invadir y colonizar otros tejidos diferentes al de su origen (Alberts, 2022).

Inicialmente, un grupo de células que crece y prolifera sin control se denomina tumor o neoplasia. Si estas células no tienen la capacidad de invadir tejidos, se conoce como tumor benigno. En cambio, si adquieren capacidad de invadir tejido circundante se clasifican como tumores malignos o cáncer. Si, además, estas células acceden al torrente sanguíneo y forman tumores secundarios en otras partes del cuerpo, se les denomina metastásicos. Esta última propiedad representa una de las principales causas de mortalidad en pacientes diagnosticados con cáncer, ya que la invasión y colonización de órganos vitales puede provocar fallos multiorgánicos (Alberts, 2022).

Uno de los eventos moleculares clave que favorecen la transformación maligna de las células es la desregulación del ciclo celular, ya que los puntos de control de crecimiento y

proliferación celular se ven alterados (Matthews et al., 2022). En condiciones fisiológicas normales, este ciclo está regulado por una red de proteínas como las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (CDK's), y los supresores tumorales p53 y RB, que trabajan en conjunto para asegurar una transición ordenada entre fases del ciclo, así como pausas cuando se detecta daño al DNA (Vermeulen et al., 2003). En células cancerígenas, la mutación o el silenciamiento epigenético de estos componentes permiten una proliferación descontrolada: por ejemplo, p53 puede perder la capacidad de inducir a p21, una proteína que bloquea a las CDK's, y RB es hiperfosforilado por estas quinasas, permitiendo la liberación de E2F para activar genes de la progresión del ciclo celular (Engeland, 2022). Esta desregulación no sólo favorece la proliferación celular, sino que además involucra la evasión de la muerte celular o la invasión de tejidos circundantes, características distintivas del cáncer.

## Ciclo Celular

En organismos eucariotas, la división celular está regulada por una red de mecanismos moleculares, puntos de control y señales bioquímicas que aseguran que no existan errores antes de permitir que la célula atraviese el ciclo celular y se divida (Matthews et al., 2022). De manera general, el ciclo celular se describe como el proceso durante el cual una célula duplica su material genético durante una interfase, para luego dividirse en la fase de mitosis, dando origen a dos células hijas genéticamente idénticas.

Los principales eventos de este ciclo son la replicación del DNA y la segregación del material genético duplicado, los cuales ocurren en momentos distintos. La replicación del DNA tiene lugar específicamente en la fase S de la interfase, mientras que la separación de los cromosomas duplicados ocurre durante la mitosis o fase M. Además, existen dos fases intermedias críticas: G1 (antes de la fase S) y G2 (posterior a la fase S). Estas fases cumplen funciones cruciales para la regulación del ciclo celular; en G1 la célula evalúa condiciones celulares para decidir si entrar al ciclo, mientras que en G2, se evalúa la decisión de iniciar el proceso de segregación de cromosomas (Matthews et al., 2022). Cada una de estas fases actúan como punto de control funcional, en el cual las células evalúan si las condiciones son adecuadas para continuar o detener su ciclo proliferativo.

En la fase G1, las células meditan la decisión de comprometerse con el inicio de la replicación del DNA para entrar en el ciclo celular o en cambio, mantenerse en etapa G1. Además, en este momento las células pueden salir de la etapa G1 hacia un estado no proliferativo conocido como quiescencia (o G0), en la cual conservan la capacidad de regresar al ciclo celular y reanudar la proliferación en respuesta a ciertos estímulos (Aguayo 2020; Matthews et al. 2022). Una vez completada la replicación del DNA, existe una segunda ventana de decisión, llamada fase G2, en la cual las células determinan si proceder a la fase

Me iniciar la condensación de la cromatina y el alineamiento cromosómico, conduciendo a la segregación del material genético (mitosis) y la distribución del contenido celular en dos células hijas (citoquinesis). Finalmente, en la fase M se concluye con el reinicio del ciclo celular al inicio de la interfase (Matthews et al., 2022). Cada una de estas fases de decisión representan un punto en el que las alteraciones genéticas o regulatorias, pueden modificar el control normal del ciclo celular, favoreciendo el desarrollo del cáncer.

En este contexto de ventanas de decisión del ciclo celular, un elemento central en la regulación de las transiciones fase a fase son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK's, por sus siglas en inglés). Las CDK's constituyen una familia de quinasas serina/treonina cuya actividad es crucial para el avance ordenado del ciclo celular (Łukasik et al., 2021). En células eucariotas, se conocen al menos 20 miembros del grupo CDK, de las cuáles CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6 están directamente implicadas en la regulación de las transiciones del ciclo celular (Juric & Murphy, 2020).

Estas quinasas requieren asociarse con moléculas reguladoras llamadas ciclinas, formando complejos activos con las CDK's que fosforilan sustratos específicos para impulsar la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E promueven la transición desde G1 hacia S, mientras que CDK1-ciclina B regula la entrada a la mitosis (Aleem & Arceci, 2015; Ding et al., 2020). De esta manera, las CDK's operan como puntos clave de las ventanas de oportunidad del ciclo celular donde pueden activarse o inhibirse bajo señales internas (como daño al DNA) o externas (como factores de crecimiento), asegurando que las células progresen en el ciclo sólo si se cumplen estos controles regulatorios (Duronio & Xiong, 2013; Wang, 2021; Kciuk et al., 2022).

Cuando estos mecanismos fallan, como ocurre con la pérdida funcional de p53, que impide la activación de p21 y su capacidad para inhibir a las CDK's; o por la inactivación de RB, que deja libre al factor de transcripción E2F, las CDK's pueden permanecer activas incluso en presencia de señales de daño genotóxico, contribuyendo así al avance no regulado del ciclo celular y al desarrollo de cáncer (Sherr & McCormick, 2002; Narasimha et al., 2014; Mansilla et al., 2020).

### **Alteraciones Funcionales Adquiridas en Células Cancerosas: Proliferación, Migración y Viabilidad**

La pérdida de control en la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK'S), derivada de alteraciones en supresores tumorales como p53 y RB, representa una de las bases moleculares más ampliamente descritas en la desregulación del ciclo celular en el cáncer. Sin embargo, esta pérdida de regulación del ciclo no sólo conduce a una

proliferación descontrolada, sino que también facilita la adquisición de otras propiedades celulares anómalas asociadas con la progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). Entre ellas, la capacidad aumentada de migración, que permite la invasión de tejidos vecinos; la resistencia a señales de muerte celular programada, que contribuyen a la viabilidad prolongada de las células tumorales; y la hiperproliferación, que resulta del desacoplamiento entre señales de crecimiento y mecanismos de control intracelular. Estas características reflejan una transformación celular profunda que permite a las células cancerígenas sobrevivir, adaptarse y expandirse más allá de sus límites fisiológicos normales (Markert et al., 2012). Por estas razones, el estudio detallado de la proliferación, la viabilidad y la migración celular en contextos tumorales no sólo permite caracterizar el comportamiento biológico en el cáncer, sino que también contribuye a identificar posibles objetivos terapéuticos.

## Proliferación

La proliferación celular es el proceso por el cual las células se replican y dividen, dando lugar a nuevas células (Wood et al., 2015). En el contexto tumoral, este mecanismo se encuentra alterado, permitiendo el crecimiento descontrolado y contribuyendo a la proliferación tumoral (Van Diest et al., 2004). El estudio de la proliferación es fundamental tanto para caracterizar el comportamiento biológico del cáncer como para evaluar su evolución clínica. Para cuantificar esta característica, se emplean métodos como la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) o ensayos colorimétricos en cultivos como MTT o Resazurina (Van Diest et al., 2004; Stockert et al., 2018; Gong et al., 2020). Por ejemplo, en estudios de osteosarcoma, la reducción de la proteína S100A9 mediante siRNA incrementó los inhibidores del ciclo celular p21 y p27, lo que resultó en la inactivación de CDK2 y CDK4, deteniendo el ciclo celular, evidenciando una relación directa entre S100A9 y la regulación de la proliferación celular vía CDK's (Cheng et al., 2016).

Por lo tanto, el análisis de la proliferación celular resulta esencial no solo para entender los mecanismos que impulsan el crecimiento tumoral, sino también para caracterizar el comportamiento maligno de las células cancerígenas y evaluar el potencial terapéutico de blancos moleculares involucrados en la regulación del ciclo celular.

## Migración

La migración celular se define como la capacidad de las células para moverse activamente del lugar donde se origina hacia otros sitios, efecto que está detrás de procesos fisiológicos como la cicatrización o la embriogénesis (Justus et al., 2014; Zha et al., 2019). En el contexto del cáncer, este proceso se encuentra desregulado por células tumorales, lo que les permite invadir tejidos vecinos, atravesar barreras tisulares y eventualmente colonizar órganos distantes (Friedl & Wolf, 2003).

Para estudiar la migración celular se emplean ensayos funcionales como el “wound healing” o “scracth assay” que permiten cuantificar la capacidad migratoria en respuesta a estímulos o tratamientos. En un estudio de cáncer de cuello uterino, la sobreexpresión de S100A9 promovió la migración de células HeLa y SiHa mediante la inducción del proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Zha et al., 2019). De manera similar, en células de carcinoma gástrico, los homodímeros S100A8/9 estimularon significativamente la migración e invasión, a través de la activación de rutas como p38 MAPK y Nf- $\kappa$ B (Kwon et al., 2013).

Debido a este tipo de estudios, el análisis de la migración celular permite comprender mecanismos que facilitan la invasión tumoral y la identificación de marcadores funcionales de agresividad y posibles blancos terapéuticos involucrados en la expansión de células cancerígenas.

## Viabilidad

La viabilidad celular se refiere a la capacidad de las células para sobrevivir y mantener funciones vitales bajo condiciones experimentales o patológicas (Feoktistova et al., 2016a). En cáncer, la viabilidad anormalmente alta permite que las células tumorales resistan estímulos adversos, como daño al DNA, estrés metabólico, o quimioterapia, contribuyendo a la progresión y resistencia tumoral (Tang et al., 2022). Para evaluar la viabilidad, se emplean métodos como ensayos colorimétricos con MTT o también ensayos de fluorescencia (Flow cytometry) con colorantes que indican la viabilidad mediante el análisis de formación de colonias (Feoktistova et al., 2016; Ghasemi et al., 2021).

Diversos estudios de viabilidad han demostrado que la reducción de S100A9 en líneas celulares tumorales conduce a una disminución significativa de la viabilidad celular. Por ejemplo, el estudio de Cheng et al., mostró que la inhibición de S100A9 mediante siRNA en carcinoma nasofaríngeo (NPC), redujo la viabilidad medida por CCK-8 y la formación de colonias (Cheng et al., 2016). En otro estudio, Shabani et al. mostró que, en cáncer gástrico, el tratamiento con el dímero S100A8/9 indujo la reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración, posiblemente debido a la alteración las vías Bax/Bcl-2 y ERK2, indicando un papel en la activación de apoptosis (Shabani et al., 2020).

El estudio de la viabilidad celular resulta fundamental para caracterizar el grado de adaptación y supervivencia de las células tumorales frente a condiciones adversas, permitiendo identificar mecanismos de resistencia terapéutica y validar blancos moleculares que sustentan el comportamiento maligno.

## Oncogénesis

Durante la oncogénesis, las células transformadas adquieren simultáneamente múltiples capacidades malignas, entre ellas la proliferación descontrolada, la migración e invasividad y la resistencia a señales de muerte celular, lo cual promueve su evolución hacia tumores agresivos y metastásicos (Markert et al., 2012).

Primero, la proliferación sostenida permite la expansión clonal inicial del tumor, pero también genera estrés en la replicación del DNA, lo que induce la inestabilidad genómica y selecciona subpoblaciones resistentes y adaptativas, impulsando así la progresión tumoral. A continuación, la remodelación tisular, incluyendo a la migración y la invasión, permite la diseminación de las células cancerígenas, aumentando las probabilidades de colonizar nuevos tejidos, lo que está directamente asociado con la mortalidad del cáncer en etapas avanzadas. Por último, la viabilidad aumentada, manifestada como resistencia a la apoptosis y adaptación a condiciones adversas, es un requisito clave para que las células metastásicas sobrevivan en entornos adversos y, además, resistan tratamientos, lo que termina de consolidar un fenotipo maligno y peligroso (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por lo tanto, el estudio conjunto de estas características destacan como puntos clave para encontrar señales de aparición de estados tumorales avanzados, marcados por agresividad, resistencia terapéutica y pronósticos desfavorables.

## Cáncer pediátrico

Durante la oncogénesis pediátrica, el desarrollo de tumores infantiles está marcado por la adquisición temprana de características malignas como la proliferación acelerada, la capacidad migratoria invasiva y la viabilidad alterada y resistente a terapias (Davidoff, 2010).

Existen estudios como el de Yin et al., en el cual se demostró el efecto de un compuesto llamado “gentiopicroside” en la viabilidad y la invasión de células de retinoblastoma (líneas celulares Y79 y WERI-Rb1), observando una disminución de la proliferación y la inhibición de la invasión tumoral (Yin et al., 2024). En el caso de leucemias infantiles como AML (Leucemia Mieloide Aguda) y ALL (Leucemia Linfóide Aguda), se ha demostrado que los niveles elevados de S100A9 promueven la viabilidad y la resistencia a tratamientos mediante la modulación de la apoptosis, el estrés oxidativo la supervivencia celular, consolidando un microambiente tumoral resistente (Mondet et al., 2021).

El conjunto de información generado por este tipo de estudios sobre las características del cáncer pediátrico representa una oportunidad valiosa para comprender la oncogénesis en enfermedades como el retinoblastoma y, además, permite la identificación de posibles marcadores oncológicos, como la proteína S100A9.

## Retinoblastoma

El cáncer de retina o Retinoblastoma es un cáncer infantil causado por una mutación en ambos alelos del gen *RB1*, que ocurre en una célula de retina en desarrollo (Knudson, 1971; Xu et al., 2014). Tras la delección del gen *RB1* (*RB1*<sup>-/-</sup>) en una célula, se piensa que esta prolifera hacia un retinoma que es un tipo de masa tumoral benigna; sin embargo, tras la acumulación de mutaciones genéticas, ocurre una inestabilidad genómica que desencadena una proliferación descontrolada (Dimaras et al., 2008).

La manera más común de detectar Retinoblastoma es con la presencia de un reflejo blanco visible a través de la pupila (leucocoria) y en ocasiones, está acompañado por estrabismo (Mendoza & Grossniklaus, 2015). Si se llega a detectar de manera temprana, el tratamiento puede ayudar a conservar los ojos y la vista del paciente, así como curar el cáncer. En el caso contrario, un diagnóstico tardío puede llevar a la invasión incurable del nervio óptico y del cerebro, así como la muerte del paciente (Dimaras et al., 2015a).

## Epidemiología

En la primera década del siglo XXI, se estimó que aproximadamente 8000 casos nuevos anuales de Retinoblastoma emergen a nivel mundial (Kivelä, 2009). Junto a esto, los estudios epidemiológicos mostraban una diferencia en la incidencia de casos de Retinoblastoma en diferentes zonas geográficas del mundo, entre ellas, Japón con una incidencia de 8.3 casos por cada mil nacimientos, Latino América con 20 casos por cada mil niños o África con 34 casos por cada mil niños (Kivelä, 2009).

También, se estimó que la tasa de mortalidad de Retinoblastoma es de 3000 a 3700 pacientes fallecidos anualmente, pero este número puede ser disminuido a 400 muertes anuales si se alcanzaran los niveles de supervivencia mundial que existen en Europa o Japón (Kivelä, 2009). Esto se podría lograr si se aumenta el nivel de conocimiento de la población acerca de Retinoblastoma mediante proyectos educativos sobre la enfermedad y la disminución del abandono del tratamiento (Kivelä, 2009). Existe además una diferencia en el tratamiento disponible dependiendo del nivel socioeconómico del país, asociándose el bajo nivel económico de un país con la poca supervivencia del paciente (Dimaras et al., 2015a).

En México, el Retinoblastoma podría ser la segunda causa más frecuente de tumores sólidos en pacientes pediátricos sin embargo no existen datos de registros suficientes en el país. La detección suele ser en etapas avanzadas (Leal-Leal et al., 2004), siendo el signo más frecuente la leucocoria (86%) seguido del estrabismo (24%) (Asencio-López et al., 2015), por lo que es necesaria la creación de métodos de detección temprana para

disminuir el número de pacientes con enfermedades oculares avanzadas y evitar tratamientos agresivos como la enucleación o la quimioterapia.

Actualmente, se requiere del seguimiento de indicadores clínicos a nivel nacional, como la tasa de supervivencia o el abandono de la terapia contra el cáncer, para conocer el avance en el tratamiento de Retinoblastoma, así como es necesario combatir la falta de investigación y las desigualdades en el acceso a tratamientos para mejorar la calidad de vida de los pacientes mexicanos (Garza-Garza et al., 2020).

## ***RB1***

El gen de susceptibilidad de Retinoblastoma o *RB1* fue el primer supresor tumoral identificado (Friend, 1986). Se encuentra en el cromosoma 13q14 (Cavenee, 1983), cuenta con 27 exones y tiene un tamaño de 180 kb; este gen codifica para la proteína RB, de un peso de 110 kDa (Mendoza & Grossniklaus, 2015).

De acuerdo con el modelo de Knudson, existen eventos mutacionales que llevan al desarrollo de una célula retinal que induce formación tumoral llamado “Two-Hit Hypothesis”, en la cual se explican los orígenes de la forma hereditaria y no hereditaria del Retinoblastoma. En esta hipótesis, un paciente hereda una mutación de línea germinal o gametos (primer “hit”) seguido de una mutación somática adquirida durante el desarrollo de la retina (segundo “hit”). En el caso de la forma no hereditaria, hay dos mutaciones distintas que se dan en ambos alelos del gen de Retinoblastoma en células somáticas particularmente en la retina en desarrollo (Knudson, 1971).

## **Proteína RB**

La proteína RB se compone de 928 aminoácidos y es una reguladora de la progresión del ciclo celular. Su estructura consiste en una región N-terminal, un dominio central “pocket” y una región C-terminal (Mendoza & Grossniklaus, 2015). La actividad más conocida de RB es la restricción de la división celular mediante su unión a factores de transcripción de la familia E2F (C. Lee et al., 2002), previniendo la unión de estos a sus elementos de respuesta en el DNA y evitando así la transición de fase G1 a la fase S del ciclo celular (Dimaras et al., 2015a).

En el caso de Retinoblastoma, la mutación de *RB1* lleva a una desregulación de la proteína RB o su ausencia, lo cual permite una actividad constante de E2F y, por lo tanto, la continua progresión del ciclo celular y la eventual formación de tumores (Mendoza & Grossniklaus, 2015).

## Clasificación de Retinoblastoma

Actualmente se clasifica el estadio de Retinoblastoma usando la Clasificación Internacional de Retinoblastoma Intraocular (o *IIRC*, por sus siglas en inglés), la cual los clasifica en grupos desde A hasta E, siendo este último el de los casos más severos (Murphree, 2005). En el grupo A, de muy bajo riesgo, se encuentran los tumores discretos menores a 3 mm; Grupo B, de bajo riesgo, presenta tumores discretos de cualquier tamaño y no presentan siembras sub retinales o de humor vítreo; Grupo C, de riesgo moderado, son aquellos ojos que presentan siembras sub retinales y en humor vítreo, además de tumores discretos de cualquier tamaño y ubicación; Grupo D, de alto riesgo, presenta ojos con siembras difusas en humor vitreo o en áreas sub retinales, además de enfermedades endofíticas o exofíticas; Grupo E, o grupo con ojos de muy alto riesgo, que presentan destrucción anatómica causada por el tumor, glaucoma neovascular irreversible, hemorragias masivas intraoculares, celulitis orbital aséptica, tumor anterior vítreo, tumor en contacto con el lente ocular, Retinoblastoma con infiltración por difusión y “phthisis” (Murphree, 2005).

## Diagnóstico

El diagnóstico de Retinoblastoma se da por signos clínicamente detectables, tales como leucocoria, estrabismo, cambio de color de iris, alargamiento de córnea o del ojo por cambios de presión interna, inflamación orbital y en casos muy avanzados, desprendimiento del ojo de su órbita (Gallie et al., 2012).

El diagnóstico histopatológico es evitado a toda costa debido a que la realización de biopsias del tumor puede aumentar el riesgo de metástasis (Karcioglu, 2000), aunque existen más formas de detectarlo como oftalmoscopia realizada por un especialista, ultrasonografía ocular, MRI o escaneo de CT (Dimaras et al., 2015a). Sin embargo, aún con esos estudios, el diagnóstico se puede confundir con otras enfermedades oculares como la enfermedad de Coats o la persistencia de la vasculatura fetal (Maki et al., 2009).

## Tratamiento de Retinoblastoma

El tratamiento de Retinoblastoma depende en gran medida del diagnóstico, así como del estado en que se encuentre el ojo opuesto, la salud y las circunstancias socioeconómicas del paciente (Dimaras et al., 2015a). Se puede escoger entre dos tipos de tratamientos, uno primario, el cual se basa en la supervivencia del paciente, la preservación de su ojo y su vista, sopesada contra las complicaciones del tratamiento a corto y largo plazo, así como un tratamiento secundario basado en cambiar el plan inicial cuando este falló en preservar el ojo (Dimaras et al., 2015a).

Los tratamientos primarios incluyen la enucleación, quimioterapia intravenosa (IVC) o terapia focal usando láser o crioterapias (Dimaras et al., 2015a). Sabemos además que pacientes de Retinoblastoma a los cuales se les enucleó ambos ojos, llevan una vida activa debido al tratamiento temprano en sus infancias. Para el caso de las terapias de segunda línea, se incluyen tratamientos de terapias focales, quimioterapia sistemática, IAC, radioterapia interna y radiación de protones al ojo (Dimaras et al., 2015a).

Actualmente, el tratamiento más utilizado es la enucleación (Mallipatna et al., 2009), ya que la mayoría de los niños que no tienen historia familiar de Retinoblastoma, son diagnosticados en las etapas más tardías del cáncer (etapas D y E). Por esta razón, es imperativo la detección temprana de Retinoblastoma que no involucre los síntomas de una enfermedad tan avanzada.

## Biomarcadores

El término biomarcador se refiere a una categoría de señales médicas objetivas que pueden ser medidas de manera precisa y son reproducibles. También se define como una sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo y que ayuda a la predicción de la incidencia o el pronóstico de una enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi cualquier medida que refleje una interacción entre sistemas biológicos y un potencial peligro químico, físico o biológico puede ser un biomarcador, así como esta medida puede ser un indicador del funcionamiento fisiológico correcto a nivel celular o molecular. Además, los biomarcadores se presentan como variables que indican la salud de un paciente y su pronóstico de manera independiente de la percepción del paciente (Strimbu & Tavel, 2010).

Existen biomarcadores de cáncer, los cuales pueden funcionar como indicadores del riesgo y ocurrencia del cáncer, así como del pronóstico del paciente. Estos biomarcadores pueden ser celulares o fisiológicos y algunos de ellos están basados en biomoléculas encontradas en tejidos o fluidos corporales producidas por células cancerígenas o por células normales en respuesta a cáncer.

El uso de pruebas de biomarcadores en cáncer involucra la caracterización de tumores o fluidos corporales para detectar cambios en el DNA, RNA, proteínas u otras biomoléculas que den información acerca del diagnóstico correcto del cáncer, de la prognosis, del tratamiento a seguir, de la respuesta a medicamentos a usar o incluso como monitoreo de la enfermedad (Sarhadi & Armengol, 2022).

En nuestro grupo de investigación se realizó un estudio de proteómica en lágrima de pacientes de Retinoblastoma comparadas contra lágrimas de pacientes control sanos y tras un análisis mediante espectrometría de masas (DIA-MS), se identificaron proteínas

desreguladas en este cáncer. Se encontraron un total de 145 proteínas exclusivas de lágrimas de pacientes con Retinoblastoma, con una marcada diferencia de expresión en comparación con los pacientes control. Una de estas proteínas es S100A9, la cual se encuentra 5 veces sobreexpresada en comparación con un grupo control, destacando como un posible biomarcador para la detección de Retinoblastoma usando lágrimas como punto de partida (Rodríguez, 2022). Además de esto, debido a sus implicaciones en otras enfermedades, S100A9 podría implicar un blanco terapéutico a estudiar debido a las distintas vías en las que se ha reportado su presencia.

## S100A9

S100A9 es una proteína de unión a calcio perteneciente a la familia de proteínas S100 (Marenholz et al., 2006). Está conformada por dos sitios de unión a calcio, uno de alta afinidad ubicado en su C-terminal y uno de baja afinidad en su N-terminal. El sitio de alta afinidad es conocido por tener la forma de una “mano humana”, por lo tanto, su clasificación como proteína “EF-hand” (Chazin, 2011; Markowitz & Carson, 2013a).

También se le conoce como “MRP-14” (“myeloid related protein of molecular weight 14kDa”) o “MRP (“migration inhibitory factor related protein”) de peso molecular 14 kDa” (Markowitz & Carson, 2013a) pero actualmente su nombre está dado por pertenecer a la familia de proteínas S100, el cual se origina porque estas proteínas son 100% solubles en sulfato de amonio (Moore, 1965).

Se ha reportado que la localización de S100A9 varía en función del tipo celular y del tipo de padecimiento estudiado, estando presente en células mieloides, células cancerígenas o en estroma de tumor. En relación con cáncer, se han reportado macrófagos que expresan heterodímeros S100A8/S100A9 en sitios de inflamación en diferentes células de cáncer, tales como adenocarcinoma de páncreas, de pulmón o de mama (Kurata et al., 2005). Esto apunta a que hay una correlación de los niveles de S100A9 en centros de inflamación en diferentes tipos de cáncer (Markowitz & Carson, 2013). Además, se ha sugerido el uso de S100A9 como un biomarcador de metástasis en pacientes de neuroblastoma (X. Chen et al., 2021).

Existe una regulación desconocida de S100A9 que involucra su participación en distintos mecanismos celulares como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis celular, la cual no se ha abarcado en su totalidad y que implica mecanismos nuevos por los cuales distintos tipos de cáncer burlan a distintos mecanismos que buscan controlarlos.

## S100A9 y la desdiferenciación celular en cáncer

La diferenciación celular es un proceso altamente regulado que ayuda a preservar la integridad de diferentes tejidos en organismos vivos. Existen mecanismos que ayudan a

balancear la muerte celular y la proliferación para preservar el orden natural de los tejidos (Sánchez Alvarado & Yamanaka, 2014).

En el caso de un tumor cancerígeno, existe un fenómeno de heterogeneidad genómica, la cual puede causar diferentes estados de dediferenciación en cáncer, implicando que podemos encontrar variaciones fenotípicas en un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral) o entre tumores de un mismo tipo de cáncer (heterogeneidad intertumoral) (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014). Este tipo de dediferenciación puede llevar a que las células de un tumor progresen de una manera más agresiva que en otros tipos de cáncer y este proceso puede ser impulsados por factores de transcripción particulares de cada tejido dediferenciado.

En el caso de S100A9, se han reportado diferentes niveles de expresión asociadas a la dediferenciación de distintos tipos de cáncer (Chen et al., 2014). El grupo de Kong JP et al. reportan que la pérdida de expresión de S100A9 en carcinoma de células escamosas de esófago causa una dediferenciación de estas células (Jian-Ping Kong, 2023). Por otro lado, el grupo de Arai et al., han reportado que la sobreexpresión de S100A9 en adenocarcinoma de pulmón, así como la coexpresión de S100A9 con S100A8 en carcinoma ductal invasivo de mama, causan la dediferenciación celular de ambos (Arai et al., 2008). En concordancia con estos hallazgos, Charan et al. (2025) sugirieron que la sobreexpresión de S100A9 podría contribuir a un estado celular menos diferenciado, ya que las alteraciones metabólicas y la resistencia al estrés oxidativo observadas en SCLC son características comunes en células tumorales con fenotipos alterados o con transición epitelio-mesénquima (EMT) parcial (Charan et al., 2025).

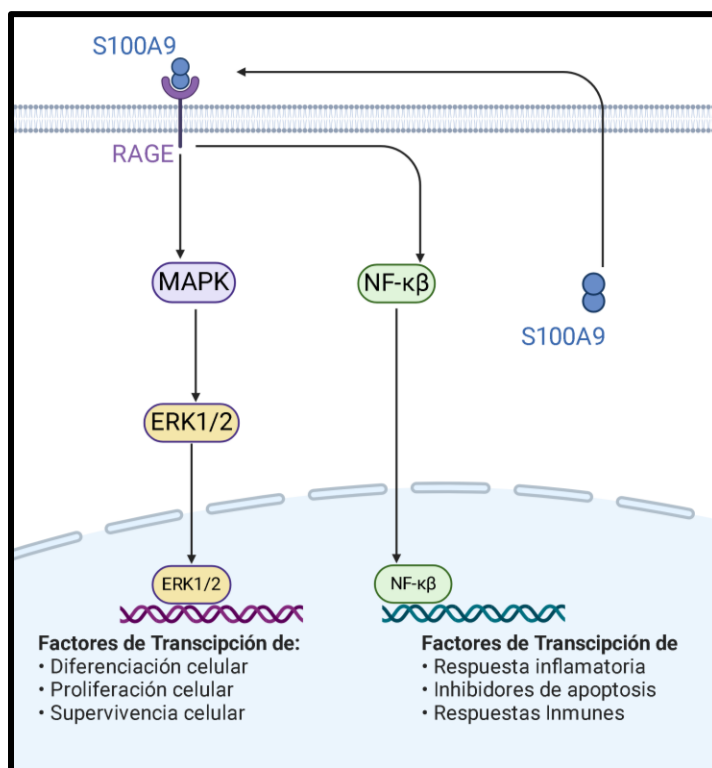
Estos descubrimientos y las diferentes condiciones en las que se llega a un mismo resultado remarcan el potencial que tiene S100A9 como blanco terapéutico y su posible implicación en distintas vías regulatorias en el cáncer.

### S100A9 y la proliferación celular en cáncer

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer, la proliferación celular se refiere al incremento del número de células como resultado del crecimiento y la división celular. En tejido normal, el crecimiento celular está altamente regulado, algo que se pierde en células tumorales y esta pérdida del control contribuye tanto a la tumorigénesis como a la metástasis en cáncer (Feitelson et al., 2015).

Actualmente, se han reportado un par de vías en las que S100A9 tiene un papel en la regulación de respuestas de diferenciación y proliferación celular (Chen et al., 2014). Este papel está dado por la interacción de S100A9 como homodímero con el receptor RAGE o “Receptor for Advance Glycation End Products”, el cual activa las vías de las Quinasas MAP

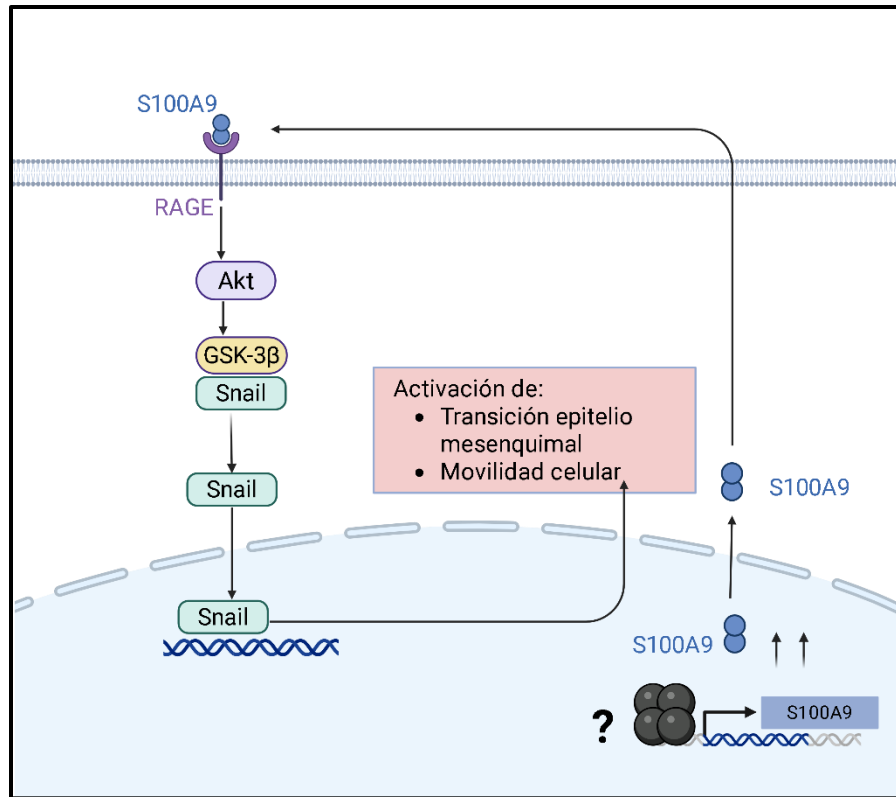
(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) y la vía de NF- $\kappa$ B (Fig. 1). La primera está relacionada con la activación de factores de transcripción de diferenciación, proliferación y supervivencia celular, mientras que la segunda está involucrada con la activación de factores de transcripción de genes de respuesta inflamatoria, inhibidores de apoptosis y de respuesta inmune (Chang et al., 2016).



**Figura 1:** S100A9 tiene actividad extracelular de activación de receptores RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products), los cuales activan cascadas de señalización que activan la vía de las Quinasas MAPs y la vía de NF- $\kappa$ B, las cuales están involucradas en la diferenciación celular o en respuestas inflamatorias (Chang et al., 2016).

El equipo de Charan et al. (2025) confirmó experimentalmente este efecto en modelos de cáncer de pulmón de células pequeñas, mostrando que la disminución de S100A9 mediante shRNA reduce drásticamente la proliferación in vivo, mientras que su sobreexpresión activa Akt y suprime GSK3 $\alpha/\beta$ , incrementando la viabilidad tumoral y la resistencia celular al estrés (Fig. 2).

Estos resultados consolidan la función pro-proliferativa de S100A9 descrita en estudios previos y sugieren una posible convergencia entre la señalización mediada por RAGE y la vía Akt/GSK-3/Snail.



**Figura 2:** Mecanismo de activación propuesto por Charan et al. de la transición MET activada por S100A9 mediante RAGE y las vías Akt-Gsk-3B-Snail (Charan et al., 2025).

## S100A9 y la apoptosis en cáncer

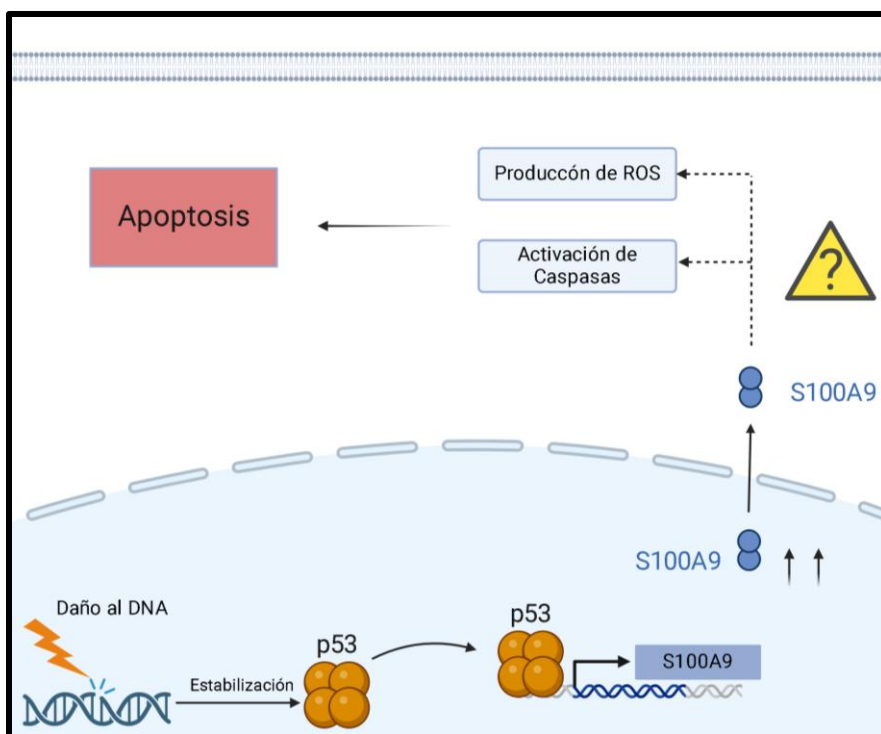
La apoptosis es una muerte celular programada que involucra la eliminación de células mediante un mecanismo de activación genético. Esta ocurre de manera normal durante el desarrollo y crecimiento de un organismo y tiene distintos propósitos que van desde mantener la población celular en un tejido hasta la defensa inmune contra células dañadas por alguna enfermedad o agente tóxico (Elmore, 2007).

En cáncer, hay una pérdida del balance que existe entre la división celular y las células que deberían haber muerto, que no recibieron las señales para entrar en apoptosis, lo cual puede suceder por una gran variedad de razones. Una de estas, es la desregulación de p53, el cual es el principal supresor tumoral y su inactivación está relacionada con una gran proporción de cánceres humanos (Wong, 2011).

Se ha reportado que p53 es un factor de transcripción que transactiva el gen de S100A9 además de que se ha relacionado su expresión con la inducción de apoptosis dependiente de p53 en condiciones de estrés genotóxico (Fig. 3) (Li et al., 2009). A pesar de esto, no se ha

reportado cuál es el mecanismo por el cual S100A9 una vez sobreexpresado, induce vías de apoptosis.

Dado que la activación de Akt y la inhibición de GSK-3 $\alpha/\beta$  descritas por Charan et al. (2025) también son vías conocidas por su capacidad de suprimir la apoptosis dependiente de p53, estos hallazgos podrían explicar porque S100A9, a pesar de estar inducido por p53 en algunos contextos, puede ejercer efectos antiapoptóticos en tumores con desregulación del eje p53/RB (S. H. Lee et al., 2009; Charan et al., 2025).



**Figura 3:** p53 es un factor de transcripción directo del gen de S100A9 y juntos promueven la apoptosis celular en condiciones de estrés genotóxico. Las posibles vías por las que S100A9 contribuye a la apoptosis no son claras hasta el momento (Li et al., 2009).

## S100A9 en Retinoblastoma

Actualmente no hay un estudio que relacione los niveles de expresión de S100A9 con la presencia de Retinoblastoma. Esto resalta la necesidad de enfocar el estudio de S100A9 como un posible biomarcador y la búsqueda del mecanismo por el cual se sobreexpresa en lágrimas de pacientes de Retinoblastoma.

El hecho de que se haya reportado la interacción con receptores extracelulares en la vía RAGE, el papel de p53 en inducción de apoptosis y más recientemente, la vía Akt/GSK-

3/Snail, amplía el panorama al demostrar que S100A9 puede coordinar respuestas de supervivencia y remodelación metabólica incluso en ausencia de señales clásicas de p53 o RB, lo que sugiere que su sobreexpresión en modelos de retinoblastoma – caracterizadas por la pérdida de RB y, la inactividad de p53 – podría conferir ventajas proliferativas y de resistencia al estrés similares a las observadas en otros modelos cancerígenos (Fig. 3). La línea celular H1299 RB -/- cumple con los preceptos anteriores por lo que se usará como modelo de estudio.

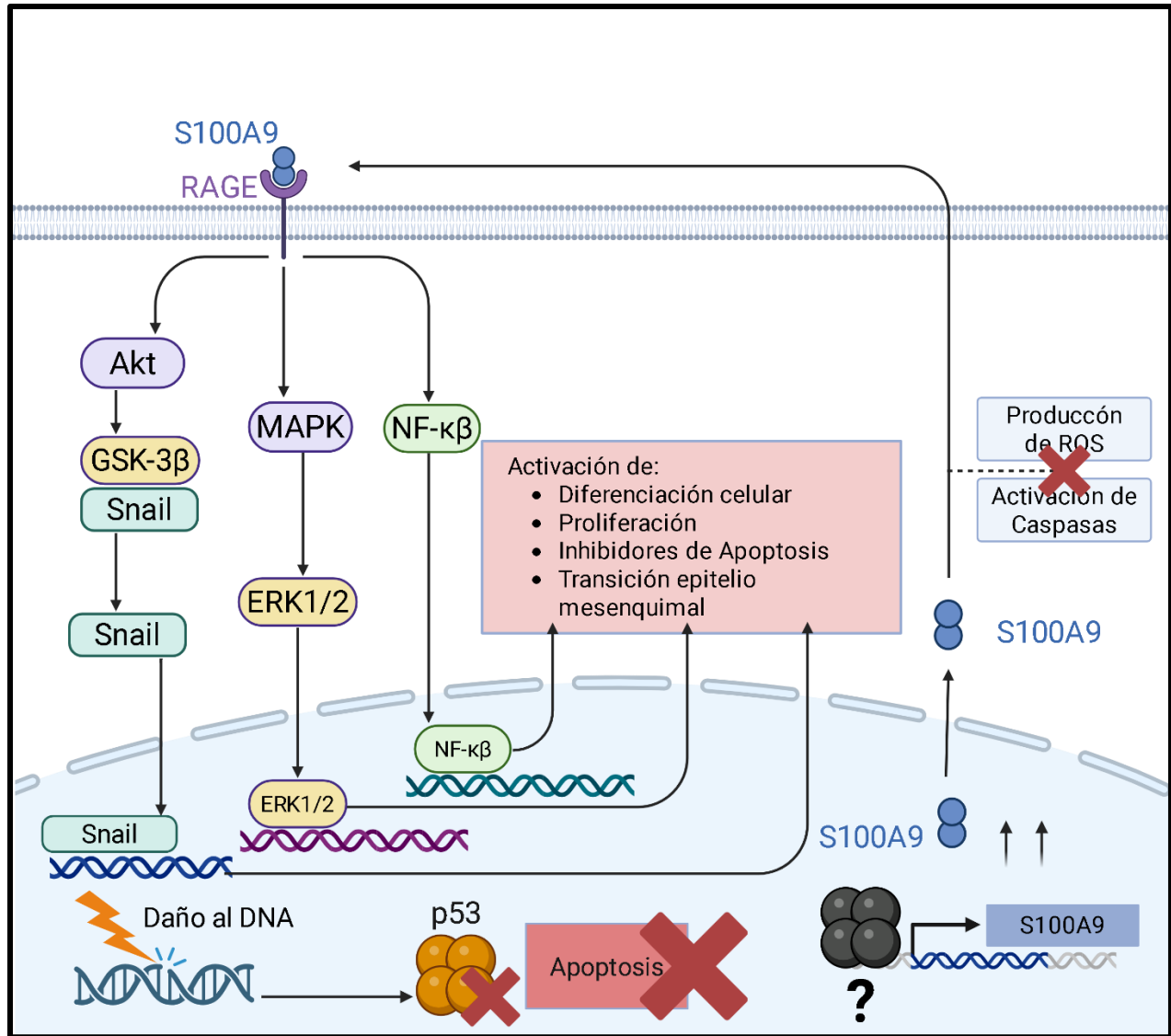
Debido a la importancia de S100A9 y de RB en la regulación del ciclo celular, es necesario entender si existe una relación directa de ellas en cáncer; además, la sobreexpresión de S100A9 en retinoblastoma, podría sugerir una relación entre la ausencia de función de RB con el alza en la expresión de S100A9. Hasta ahora, la literatura carece de estudios contundentes que aborden esta relación desde un enfoque directo. Se ha demostrado que S100A9 juega un papel importante en potenciar fenotipos oncogénicos en diversos cánceres, como el caso del trabajo experimental de Biswas A. et al., en el cual mostraron que la expresión de S100A9 está aumentada en un modelo cáncer de pulmón metastásico mutado para EGFR (Biswas et al., 2022). El caso del trabajo de Rigracciolo et al. en cáncer de mama triple negativo (TNBC) mostró que S100A9 en complejo con la proteína S100A8, estimula la proliferación y migración vía activación del receptor RAGE, activando cascadas de señalización que involucran a las quinasas FAK y la vía Hippo/YAP (Rigracciolo et al., 2022); el estudio de Zhong et al. en carcinoma hepatocelular, relaciona a S100A9 con la actividad mitocondrial aumentada y el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), procesos que contribuyen a las habilidades proliferativas y migratorias de células cancerígenas. Adicionalmente, el trabajo de Charan et al. (2025) aporta evidencia funcional complementaria: en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), muestra que S100A9 activa la vía Akt/GSK3 $\alpha$ / $\beta$ /Snail, promoviendo la supervivencia celular e inhibiendo la autofagia vía MAGE-A3, favoreciendo la proliferación y migración. La ausencia de S100A9 o su inhibición reduce significativamente el crecimiento tumoral, la proliferación, la neovascularización y remodela el microambiente inmunitario (Charan et al., 2025). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se explora la relación con el supresor de tumores RB.

La principal relación documentada entre S100A9 y mecanismos regulatorios que implican a RB, corresponde a la influencia de S100A9 sobre la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK's). En particular, los estudios de Khammanivong et al., revelan que S100A9 (en conjunto con S100A8), regula la progresión del ciclo celular en modelos de carcinoma oral de células escamosas y en osteosarcoma, al modular eventos de fosforilación y alterando la expresión de inhibidores de CDK's como p21 y p27 (Khammanivong et al., 2013). Además, en el trabajo de Zhang et al. en un modelo de células

mamarias epiteliales, mostraron una relación entre el silenciamiento de S100A9 y la regulación negativa de CDK's (CDK1 y CDK2) y de la ciclina D1, sugiriendo que S100A9 ejerce un efecto regulatorio positivo en la progresión del ciclo celular. Estos estudios sugieren que S100A9 tiene un papel modulador de proteínas reguladoras del ciclo celular, influenciando la proliferación de células cancerígenas a través de sus efectos en la actividad de las CDK's.

Sin embargo, al considerar la pregunta específica de si S100A9 tiene un efecto directo en la actividad de CDK's y consecuentemente el estado de fosforilación de RB (reguladora clave de la transición de fase G1/S), la evidencia actual en la literatura no es tan extensa como la de sus papeles individuales. Si conocemos que S100A9 es un potenciador de la proliferación celular y, además, la ausencia de RB significa división celular descontrolada, el conjunto de ambos efectos implicaría la constante entrada a la mitosis por regulación positiva de CDK1/2 y, por otro lado, la ausencia de RB, la constante activación de genes de proliferación celular, potenciando aún más los efectos proliferativos de células cancerígenas.

Estos hallazgos sugieren que, en un contexto de ausencia de RB, la capacidad de S100A9 para promover supervivencia, migración y angiogénesis podría estar potenciada a través de una vía Akt/GSK-3/Snail, complementaria o independiente de su efecto sobre las CDK's. Esto refuerza el potencial de S100A9 como un mediador clave de progresión tumoral y como blanco terapéutico, especialmente en situaciones de disfunción de supresores tumorales como RB.



**Figura 3:** Resumen de las interacciones intra y extracelulares en las que S100A9 está involucrada. Se remarca la ausencia de información de algunos de estos mecanismos (Li et al., 2009; Chang et al., 2016; Charan et al., 2025).

## Hipótesis:

Si la proteína S100A9 es sobreexpresada en células de cáncer de pulmón H1299, entonces se inducirá la viabilidad, la proliferación y la migración de éstas células.

## Objetivo general:

Analizar los efectos de la expresión diferencial de S100A9 sobre la dinámica celular en células H1299 WT y H1299 RB <sup>-/-</sup>.

## Objetivos específicos:

- Estudiar los efectos de la sobreexpresión de S100A9 sobre la viabilidad celular de células H1299 WT y H1299 RB (-/-).
- Estudiar los efectos de la sobreexpresión de S100A9 sobre la proliferación celular de células H1299 WT y H1299 RB (-/-).
- Estudiar los efectos de la sobreexpresión de S100A9 sobre la dinámica de migración celular de células H1299 WT y H1299 RB (-/-).

## Metodología

### Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se realiza buscando la información de la secuencia de mRNA en la base de datos de acceso abierto “National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information” y verificando que la secuencia en formato FASTA reportada en este sitio, sea la que codifica para la proteína de interés. Una vez seleccionada la secuencia, es necesario buscar los codones de inicio y de paro, para introducir una secuencia que va a ser reconocida por enzimas de restricción y que serán útiles para la selección de nuestro gen de interés.

En este trabajo se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

S100A9 F: cccggatccatgacttgcaaaatgtcg

S100A9 R: ggggatatcctagccccacagcca

GAPDH-q F: tccaaaatcaagtggggcga

GAPDH-q R: tgatgacccttttggtccc

S100A9-q F: gcagctggacgcaacatag

S100A9-q R: ccactgtgatcttgccact

HPRT-q F: agccagacttgggtgattg

HPRT-q R: ttactggcgatgtcaatagg

### Producción de RNA

A partir de sangre, se hace un protocolo de extracción de RNA con trizol.

- 1) A una muestra de plasma, se le agrega 1 ml de trizol y se deja reposar durante 5 min a temperatura ambiente.
- 2) Adicionamos 200 µl de cloroformo y agitamos rigurosamente durante 15 segundos. Incubamos 3 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Centrifugamos a 12,000 RPM durante 15 minutos a 4°C.
- 4) El paso anterior formará una solución de tres fases por diferencia de densidad, se tomará la capa superior y se transferirá a un tubo Eppendorf nuevo.
- 5) Adicionamos 500 µl de isopropanol por cada 1 ml de trizol utilizado, agitamos suavemente e incubamos 10 minutos a temperatura ambiente.

- 6) Centrifugamos a 12,000 RPM durante 20 minutos a 4°C. Se formará un pellet gelatinoso y deberemos decantar el sobrenadante.
- 7) Agregar 1 ml de etanol al 75% y re suspendemos el pellet.
- 8) Centrifugamos a 12,000 RPM por 5 minutos a 4°C y al finalizar, se decanta el sobrenadante.
- 9) El pellet de RNA se deja secando al aire libre, cubriendo con un papel el tubo para evitar la contaminación. Una vez seca, el pellet pasará de color blanco a transparente.
- 10) Se resuspende con 20 µl a 50 µl de agua estéril de nivel de biología molecular.
- 11) Se guarda el RNA a -20°C para el paso de producción de cDNA.

## Producción de cDNA

Un DNA complementario (cDNA) puede ser sintetizado *in vitro* a partir de mRNA o de RNA total utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT), la cual es una DNA polimerasa dependiente de RNA, que utiliza como partidor un oligonucleótido poly(dT). Luego de desnaturalizar el RNA, mediante calor, el oligonucleótido poly(dT) es alineado con el extremo poly(dA) de éste y actúa como punto de inicio para la síntesis 5' → 3' de una molécula complementaria al RNA, la cual es un cDNA de hebra simple. El cDNA obtenido corresponde a la totalidad de la población de RNA presente al inicio de la síntesis (Zabradý et al., 2023).

### Materiales:

- a) RNA total
- b) M-Mulv Reverse Transcriptase Cat: #N01-M0253S
- c) Oligo(dT)
- d) dNTPs
- e) Agua libre de RNAsas.

El protocolo de producción de cDNA es el siguiente:

- 1) Prepare la siguiente reacción:
  - RNA                    x µl
  - Oligo dT            1,0 µl
  - dH2O                y µl
- 2) Ajustamos a 15 µl de reacción total.
- 3) Se incuba 5 minutos a 70°C y luego se pasa directamente a hielo.

4) Ahora agregamos los siguientes reactivos:

- Buffer enzima 5,0  $\mu$ l
- dNTPs 1,5  $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O 2,5  $\mu$ l
- Enzima M-MLVRT 1  $\mu$ l

5) Deberemos tener 25  $\mu$ l totales, esto se mezcla en vortex suavemente.

6) Centrifugamos mediante spin corto para obtener la mezcla y los componentes de la reacción en el fondo.

7) Incubamos a 42°C durante una hora.

8) Almacenamos a -20°C.

## PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la producción (amplificación) de un segmento específico de DNA. Implica el uso de fragmentos cortos de DNA sintético, llamados “primers” u oligonucleótidos, como forma de seleccionar el gen a amplificar seguido de múltiples sesiones de síntesis de DNA en un termociclador para su amplificación en miles de millones de copias (Rahman et al., 2013).

Material y soluciones:

- a) Buffer de polimerasa 10X
- b) Enzima Polimerasa
- c) Oligonucleótidos “Forward” y “Reverse”
- d) Solución de dNTPs
- e) cDNA templado
- f) Agua estéril, nivel de biología molecular
- g) Pipetas de entre 1  $\mu$ l y 100  $\mu$ l
- h) Tubos Eppendorf de 100  $\mu$ l

Preparación de la reacción:

- 1) En un tubo Eppendorf, comenzaremos a agregar las soluciones en el siguiente orden: agua, buffer de polimerasa, oligonucleótidos “Forward”, oligonucleótidos “Reverse”, dNTPs, DNA templado y finalmente, la enzima polimerasa.
- 2) El volumen de la reacción depende del DNA que se vaya a amplificar (normalmente se agrega 50  $\mu$ g de DNA total a la reacción) y en base a esto, se ajusta la cantidad de enzima polimerasa y del agua para ajustar la reacción al volumen deseado.

Generalmente, se maneja un volumen de reacción de 50 µl, agregando 1 µl Enzima Polimerasa, 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada oligonucleótido, 10 µl de buffer de enzima polimerasa y de 1 a 2 µl de DNA templado, el resto se ajusta con agua para llegar a 50 µl de reacción total.

- 3) Después de tener lista la reacción, se utiliza un termociclador especial para lograr las condiciones de desnaturalización de la doble cadena de DNA y la posterior síntesis de nuestro gen de interés.
- 4) La revelación del DNA amplificado se hace mediante geles de agarosa, cortado de banda y purificación del DNA.

En este protocolo se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

S100A9 F: cccggatccatgacttgcaaaatgtcg

S100A9 R: ggggatatcctagccccacagcca

GAPDH F: tccaaaatcaagtggggcga

GAPDH R: tgatgacccttttggtccc

## RT-qPCR

La reacción de RT-qPCR combina la transcripción reversa (RT), que convierte el ARN en cDNA, con la amplificación cuantitativa en tiempo real, empleando detección mediante intercalante (SYBR Green) o sonda (TaqMan). Esta técnica permite cuantificar cambios relativos o absolutos en los niveles de transcripción con alta sensibilidad y amplio rango dinámico, siempre que se controle la calidad del RNA, la eficiencia de la reacción y la adición de controles adecuados (Ginzinger, 2002). Además, permite la visualización en tiempo real de reacciones sin necesidad de utilizar un gel de agarosa, proporcionando resultados cuantitativos directos (Adams, 2020).

Asimismo, la RT-qPCR permite analizar los cambios de expresión en genes tras la aplicación de un tratamiento determinado en modelos celulares, partiendo de una muestra de RNA de buena calidad, lo que garantiza resultados precisos según el método de detección empleado (Adams, 2020). Uno de los métodos más comunes de detección, se basa en el uso de colorantes fluorescentes que se unen de manera inespecífica al DNA de doble cadena durante su síntesis, emitiendo señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA generado (e.g. SYBR Green). De este modo, a mayor cantidad de DNA sintetizado en la reacción de qPCR, más señal fluorescente será emitida (Adams, 2020).

Por otra parte, el uso de sondas específicas como las TaqMan proporcionan una alternativa más precisa, ya que permiten detectar una secuencia particular dentro del fragmento amplificado mediante una sonda marcada con fluoróforo y un inhibidor (o quencher) (Heid et al., 1996). Durante la extensión de la cadena por la DNA polimerasa, la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima degrada la sonda, separando el fluoróforo del quencher y emitiendo una señal fluorescente proporcional a la cantidad del producto amplificado (Holland et al., 1991). Este sistema ofrece mayor especificidad y menor interferencia por amplificaciones inespecíficas, siendo ampliamente utilizados para cuantificar de manera absoluta la expresión de genes (Bustin & Nolan, 2004).

Componentes necesarios:

- a) Reactivos para extracción de RNA: fenol-cloroformo (TRIzol) y material para control de calidad.
- b) DNasa y buffer adecuado.
- c) Reactivos para RT: M-Mulv Reverse Transcriptase Cat: #N01-M0253S
- d) Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Cat: #0222)
- e) Primer's específicos del gen de interés.
- f) Placas/tubos de qPCR y sello o tapa adhesiva compatible con fluorescencia.
- g) Controles: no-RT, no-template control, control housekeeping.
- h) Equipamiento: equipo de qPCR con lectura de SYBR Green y software, pipetas calibradas y campana de extracción para trabajar con RNA.

Protocolo en dos pasos (RT separado de qPCR):

Aislamiento y control de calidad de RNA:

- 1) Extraer el RNA total siguiendo el protocolo de extracción por TRIzol (Revisar protocolo de Producción de RNA), evitando la degradación por RNasas.
- 2) Tratar el RNA con DNasas para eliminar el DNA genómico, para reducir falsos positivos en qPCR.
- 3) Medir concentración y pureza (A260/280, A260/230) por espectrofotometría y evaluar integridad en gel de agarosa de ser necesario.

Síntesis de cDNA (RT):

- 1) Realizar síntesis de cDNA dependiendo (Revisar protocolo de Producción de cDNA).
- 2) Preparar la reacción según el kit para un volumen final de 25 µl.
- 3) Incubar según condiciones del kit e inactivar la RT.
- 4) Almacenamos a -20°C.

Diseño y validación de primers específicos:

- 1) Diseñar primers que amplifiquen 70-150 bp (ideal para SYBR Green), evitar secuencias con auto-complementariedad.
- 2) Verificar la especificidad por BLAST contra genoma de la especie.
- 3) Validar eficiencia de PCR para cada par de primers generando una curva estándar de dilución seriada del cDNA y calculando la eficiencia.

Preparación de la reacción qPCR con SYBR Green:

- 1) Preparar una mezcla inicial (master mix) en volumen 2X según el fabricante (Ej. 10 µl 2X SYBR Green Master Mix, 0.5 µl de primer F y R (10 µM), X µl de cDNA, completar a 20 µl con agua libre de nucleasas).
- 2) Incluir réplicas técnicas (triplicado) y controles.
- 3) Ciclo térmico para SYBR: activación inicial de la polimerasa (95°C – 10 min según master mix), seguido de 40 ciclos de 95°C – 10 s (desnaturalización) y 55-60°C – 30 a 60 s (alineamiento y extensión); finalizar con curva de fusión (melting curve) para verificar la especificidad del producto.

Análisis de datos:

- 1) Verificar las curvas de amplificación y ausencia de señal en no-template control y RT(-); comprobar la “melting curve” para un pico único que confirme producto específico.
- 2) Calcular Ct (umbral) para cada réplica técnica y promediar réplicas válidas.
- 3) Para cuantificación relativa usar método  $\Delta\Delta Ct$  (comparar  $\Delta Ct$  muestra-control y luego  $\Delta\Delta Ct$ ) y convertir a “fold changes” =  $2^{(-\Delta Ct)}$  si las eficiencias de los ensayos son cercanas a 100% o usando corrección por eficiencia si no lo son.

En este protocolo se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

S100A9-q F: gcagctggacgcaacatag

S100A9-q R: ccactgtgatcttgccact

HPRT-q F: agccagacttgggtgatttg

HPRT-q R: ttactggcgatgtcaatagg

## Electroforesis de DNA con Agarosa

La técnica de electroforesis de DNA en geles de agarosa es una herramienta fundamental para visualizar fragmentos de DNA, permitiendo su identificación por tamaño e incluso su purificación para otros experimentos. Esta técnica utiliza un campo eléctrico para inducir el

movimiento de los fragmentos de DNA a través de un gel de agarosa, el cual está compuesto de residuos de L y D-galactosa unidos mediante enlaces glicosídicos. Esta composición forma fibras con radios de 20 a 30 nm y su transformación en gel forma una estructura tridimensional de canales con diámetros de entre 50 a 200 nm, a través de los cuales migran las moléculas de DNA (Sambrook, 2014).

La migración ocurre a una velocidad proporcional al número total de pares bases del fragmento de DNA, de modo que aquellas moléculas más grandes y de mayor longitud, se desplazan más lentamente debido a la mayor fricción generada con la estructura del gel de agarosa. Una manera de ajustar esta migración consiste en modificar la concentración de agarosa dependiendo del tamaño del DNA que se desea visualizar, lo que permite observar fragmentos desde 50 a 20,000 pares de bases (Lee et al., 2012).

Para determinar el tamaño de los fragmentos, se utiliza un marcador de peso molecular (DNA Ladder), que sirve como referencia para identificar nuestro fragmento de interés. Sin embargo, la visualización no puede realizarse únicamente con el gel de agarosa, ya que requiere un agente intercalante que se una al DNA durante o después de la corrida electroforética. Este agente, como el bromuro de etidio, permite observar las bandas de DNA bajo luz ultravioleta. De esta forma, es posible identificar visualmente el fragmento deseado y, mediante la comparación con el marcador de peso molecular, estimar su tamaño en relación con el valor teórico esperado (Sambrook, 2014).

Para la electroforesis requerimos los siguientes componentes:

- a) Gel de agarosa
- b) Marcador de peso molecular
- c) Buffer de corrida (TAE 1X)
- d) Colorante intercalante (EtBr: Bromuro de Etidio)
- e) Buffer de carga (5X)
- f) Cámara de electroforesis y fuente de poder.
- g) Lámpara UV.
- h) Guantes y gafas protectoras de luz UV.

Preparación del gel:

- 1) Elegir el % de agarosa según el tamaño del fragmento: 0.8% a 1% para 500-3000 bp; 1.0-1.5% para 200-1000 bp; 2.0% para <300 bp.
- 2) Disolver la agarosa en buffer TAE 1X, calentando la solución hasta obtener una disolución total (de 30 segundos a 1 minuto en microondas). Dejar atemperar.
- 3) Añadir bromuro de etidio, de 1 a 3 µl dependiendo del volumen de la solución (o 0.5 µg/ml).

- 4) Verter en molde con peine y dejar solidificar (entre 15 a 25 minutos).

Preparación de muestras y carga:

- 1) Mezclar el producto de PCR o el DNA a analizar con buffer de carga 5X. Centrifugar brevemente.
- 2) Colocar el gel en la cámara de corrida con buffer TAE 1X y retirar el peine cuidadosamente.
- 3) Cargar de 5 a 10  $\mu$ l por pozo (ajustar según la concentración) y, además, cargar de 3 a 5  $\mu$ l de marcador.
- 4) Cerrar la cámara de corrida y conectar a fuente de poder. Correr de 50 a 100V dependiendo del tamaño del producto. El tiempo de corrida puede variar entre 15 a 45 min, según el tamaño del DNA.
- 5) Una vez separado el DNA correctamente, transferir el gel a una cámara de visualización con UV y tomar imágenes del gel.

## Digestión y desfosforilación de DNA

La digestión del DNA se hace para limpiar nuestro DNA amplificado en el paso de PCR. Debido a la introducción de nucleótidos extra a los deseados en nuestra secuencia, los oligonucleótidos se diseñan con un par de secuencias reconocidas por enzimas de restricción, las cuales harán cortes en el DNA y eliminarán aquellas secuencias extras cerca del inicio y el fin de nuestro gen de interés.

Para la digestión requerimos las siguientes soluciones:

- a) DNA
- b) Buffer 3.1
- c) Enzimas de restricción acorde a los oligonucleótidos diseñados
- d) Agua estéril nivel biología molecular

El proceso de digestión requiere:

- 1) Se hace una mezcla de 20  $\mu$ l para nuestro DNA de interés, junto a una mezcla para nuestro plásmido al cual insertaremos el DNA, en este caso, pcDNA 3.1 (+).
- 2) Se incuba en baño maría a 37°C, durante 16 horas.

El paso de desfosforilación se realiza para eliminar la posibilidad de que nuestro plásmido e inserto se junten de nuevo con otra cadena de DNA, manteniendo siempre abiertas las cadenas para poder hacer el paso de ligación entre DNA de interés y el vector.

- 1) Al volumen final del paso de digestión, se le agrega 3 µl buffer de fosfatasa 10X y 1.5 µl de enzima fosfatasa.
- 2) Ajustamos a 30 µl con agua estéril de nivel molecular.
- 3) Se incuba en baño maría a 37°C durante 2 horas.

A partir de aquí, existen dos maneras de cuantificar. Una es mediante un gel de agarosa para ver el tamaño de banda de nuestro DNA y a partir de una medida empírica, se calcula la cantidad de microlitros a utilizar en la reacción de ligación o mediante cuantificación por “nanodrop”.

## Ligación de DNA en plásmido

La ligación de DNA se hace para insertar nuestro gen de interés en un vector o plásmido de clonación, que se puede replicar de manera autónoma al introducirse a una bacteria en crecimiento (como *E. coli* Top10 o DH5α).

Para la ligación necesitamos los siguientes reactivos:

- a) Vector de DNA (pcDNA 3.1(+))
- b) Inserto de DNA (gen de interés)
- c) Buffer de Ligasa T4 10X
- d) Agua estéril libre de nucleasas

Los pasos para realizar la reacción de ligación son:

- 1) Se hace una reacción en un tubo Eppendorf, en mi caso, utilizaré un volumen final de 20 µl.
- 2) Se agregan 1 µl de vector, inserto de DNA en proporción molar 3:1 (inserto:vector) y 2 µl de buffer de ligasa T4.
- 3) Se ajusta con agua estéril a volumen final de 20 µl.
- 4) Se incuba a 16°C durante 16 horas en el termociclador o a 4°C durante 16 horas, dependiendo de las condiciones de la enzima.

## Transformación (DH5α)

En este caso se utilizarán células de *E. coli* DH5α para el paso de transformación. Estas células son resistentes al antibiótico ampicilina.

- 1) En un lugar estéril, se agregan 10 µl de nuestro plásmido previamente ligado con el gen de interés a un vial de células DH5α.

- 2) Se incuba durante 30 minutos en hielo a 4 °C.
- 3) Después, se hace un choque térmico en “termoblock” a 42°C durante 45 segundos.
- 4) En zona estéril, agregamos 400 µl de medio LB sin antibiótico.
- 5) Usando una incubadora especial, se incuba durante 1 hora a 37°C a 200 RPM.
- 6) Centrifugamos durante 30 segundos a 3000 rpm.
- 7) Decantamos y dejamos aproximadamente 100 µl de medio, con el cual vamos a re-suspender el pellet de bacterias.
- 8) Sembramos en una placa de LB con antibiótico ampicilina.
- 9) Incubamos a 37°C durante 16 horas.

A partir de este último paso, tendremos una placa de medio con colonias de bacterias que pueden haber sido conferidas con el plásmido que nos interesa.

### Proceso de selección de colonias para PCR y preparación de pre-cultivo

Debemos seleccionar un número de colonias a las cuales les haremos PCR para verificar la inserción del plásmido y del inserto. Por lo que previo a la selección de colonias, preparamos una solución de PCR inicial la cual se dividirá en el número de tubos necesarios para las colonias seleccionadas.

- 1) En condiciones estériles, se prepara medio LB en un tubo Eppendorf de 15 ml.
- 2) Tomaremos 5 ml de medio LB y le agregaremos 5 µl de antibiótico de ampicilina, repitiendo esto para cada colonia seleccionada.
- 3) Identificamos en nuestra placa las colonias a picar.
- 4) Con una punta de pipeta de 10 µl, tallamos la colonia seleccionada sin tomar medio sólido para evitar la obstrucción de la punta.
- 5) En nuestra solución de PCR previamente preparada, insertamos y extraemos la punta con colonia bacteriana un número arbitrario de veces, sin soltar la punta y sin accionar la pipeta.
- 6) Estos tubos se llevan a termociclador y se realiza la reacción de PCR.
- 7) Ahora, tomando los tubos con medio LB y antibiótico procedemos a hacer la siembra.
- 8) Con la misma punta del paso anterior, esta se introduce en el tubo con medio, accionamos varias veces y finalmente soltamos la punta dentro del medio.
- 9) Se incuban estos tubos de pre-cultivo a 37°C, durante 16 horas a 200 RPM.

## SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida se forman por la reacción de la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilenobisacrilamida) que produce una matriz de gel muy reticulada. El gel actúa como un tamiz a través del cual se mueven las proteínas en respuesta al campo eléctrico. Las proteínas contienen una carga global positiva o negativa; esto permite el movimiento de una molécula de proteína hacia el punto isoeléctrico en el cual la molécula no tiene carga neta. Al desnaturalizar las proteínas y proporcionarles una carga negativa uniforme, es posible separarlas en función de su tamaño a medida que migran hacia el electrodo positivo (Nowakowski et al., 2014).

### Materiales y reactivos:

- a) Cámara de electroforesis vertical con fuente de alimentación
- b) Placas de vidrio
- c) Espaciadores
- d) Peinas
- e) Disolución de acrilamida/bisacrilamida
- f) Tris-HCL 1.5 M, pH 8.8 (para gel separador)
- g) Tris-HCL 0.5 M, pH 6.8 (para el gel concentrador)
- h) Buffer de carga
- i) Buffer de migración (Tris-HCL 25mM, Glicina 200 mM, SDS 0.1%)
- j) SDS al 10%
- k) Persulfato de amonio
- l) TEMED

### Pasos:

- 1) Limpie las placas de vidrio y los espaciadores de la unidad de preparación del gel con agua desionizada y etanol.
- 2) Monte las placas con los espaciadores en una superficie estable y uniforme.
- 3) Prepare la disolución de gel separador utilizando los siguientes volúmenes (para 10 ml) dependiendo del porcentaje de gel requerido.

| % de gel | Agua (ml) | 30% acrilamida (ml) | Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (ml) | SDS al 10% (μl) | APS al 10 % (μl) | TEMED*(μl) |
|----------|-----------|---------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|------------|
| 8%       | 4,6       | 2,6                 | 2,6                         | 100             | 100              | 10         |
| 10%      | 3,8       | 3,4                 | 2,6                         | 100             | 100              | 10         |
| 12%      | 3,2       | 4,0                 | 2,6                         | 100             | 100              | 10         |
| 15 %     | 2,2       | 5,0                 | 2,6                         | 100             | 100              | 10         |

\*TEMED debe ser el último ingrediente en ser añadido

- 4) Vierta la disolución de gel en las placas montadas con los espaciadores. Para mantener una superficie de gel separador uniforme y horizontal, cubra la superficie con agua o isopropanol
- 5) Deje fijar el gel durante unos 20-30 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Prepare la disolución de gel concentrador utilizando los siguientes volúmenes (para 10 ml):

| % de gel | Agua (ml) | 30% acrilamida (ml) | Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (ml) | SDS al 10% (μl) | APS al 10 % (μl) | TEMED* (μl) |
|----------|-----------|---------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|-------------|
| 5 %      | 5,86      | 1,34                | 2,6                         | 100             | 100              | 10          |

- 7) Deseche el agua o el isopropanol superpuesto sobre el gel separador
- 8) Agregue disolución de gel concentrador al 5 % hasta que se desborde. Introduzca inmediatamente el peine asegurándose de que no queden burbujas de aire atrapadas en el gel o cerca de los pocillos.
- 9) Deje fijar el gel durante unos 20-30 minutos a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras:

- 1) A un volumen de muestra de proteínas (lisado celular o tisular), agregue el mismo volumen de tampón de carga.
- 2) Hierva la mezcla anterior a 95 °C durante 5 min. Centrifugue a 16,000 x g durante 5 minutos.
- 3) Estas muestras se pueden conservar a -20 °C o se pueden utilizar para proceder con la electroforesis en gel.

## Western Blot

La inmunoelectrotransferencia o “Western Blotting” se refiere a la transferencia electroforética de proteínas desde geles de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio hasta

membranas de PVDF o nitrocelulosa, seguida de la inmunodetección de las proteínas utilizando anticuerpos con detección fluorescente o quimioluminiscente (Mahmood & Yang, 2012).

#### Materiales y reactivos:

- a) Tanque de transferencia y fuente de alimentación.
- b) Plataforma agitadora para incubar.
- c) Gel SDS-PAGE (revisar protocolo de SDS-PAGE).
- d) Membrana de nitrocelulosas (0.2-0.45  $\mu$ m).
- e) Papel filtro y esponjas para transferencia.
- f) Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina).
- g) Metanol (10-20% según el tamaño de la proteína).
- h) Solución bloqueadora (Leche baja en grasas al 5% en PBS 1X).
- i) Anticuerpo primario específico y anticuerpo secundario conjugado (HRP).
- j) PBS 1X (7.4 pH) y PBS 1X + Tween 20 (1%).
- k) Pierce ECL Western Blotting Substrate Ref: 32106.
- l) Solución Ponceau S para comprobar transferencia.

#### Procedimiento:

- 1) Realizar SDS-PAGE y detener la ejecución cuando el marcador de proteína llegue al fondo; cortar el excedente de gel de ser necesario.
- 2) Preparar la membrana de nitrocelulosa humedeciendo en agua destilada antes del montaje.
- 3) Preparar un “sándwich” de transferencia sumergiendo las esponjas y papeles filtro en buffer de transferencia, asegurándose de eliminar las burbujas de aire.
- 4) Ensamblar en el siguiente orden (desde electrodo negativo a positivo): esponja, papel filtro, gel SDS-PAGE, membrana de nitrocelulosa, papel filtro, esponja.
- 5) Asegurarse de eliminar burbujas entre el gel y la membrana con espátula de plástico, removiendo suavemente. Esto evitará zonas sin transferencia adecuada.
- 6) Introducir el “sándwich” en el tanque de transferencia lleno con buffer de transferencia que contenga metanol.
- 7) Ejecutar la transferencia a 100 V, ajustar el tiempo según el tamaño de la proteína a transferir.
- 8) Una vez finalizado, retirar la membrana y sumergir en solución Ponceau S durante 1-5 minutos para visualizar bandas transferidas. Lavar con agua para retirar el exceso.
- 9) Enjuagar la membrana con PBS 1X más Tween 20 y proceder al bloqueo.
- 10) Se bloquea la membrana con Leche al 5% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.

- 11) Incubar la membrana en anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (según la recomendación del proveedor; típicamente O/N a 4°C o 1-2 horas a temperatura ambiente).
- 12) Incubar con anticuerpo secundario conjugado a HRP (dilución según fabricante) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- 13) Lavar la membrana 3 veces durante 10 minutos con PBS 1x + Tween 20.
- 14) Preparar el sustrato ECL según las instrucciones del fabricante y exponer la membrana al sustrato durante el tiempo recomendado (1-2 minutos).
- 15) Detectar señal por película radiográfica; ajustar tiempos de exposición para evitar saturación y obtener una buena cuantificación.

## Viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular miden diferentes marcadores celulares como indicios de la salud celular. Hacen referencia a la cantidad de células sanas en una población, mediante el uso de diferentes ensayos que permitan determinar la actividad enzimática de las células, su integridad de membrana, entre otros. Estos métodos pueden ir desde ensayos de citotoxicidad hasta detección de vías celulares específicas.

En este caso se realizarán experimentos de viabilidad, proliferación y migración celular para estudiar el efecto de la sobreexpresión S100A9 en diferentes líneas celulares, comenzando con células de cáncer de pulmón H1299 WT y las H1299 RB (-/-) las cuáles tienen la mutación RB1-/-.

Para esto se usarán tres protocolos: Tinción con Cristal Violeta (Viabilidad), Ensayo con Resazurin (Proliferación Celular) y Ensayo “Wound Healing” (Migración Celular).

## Tinción con Cristal Violeta

Las células adherentes una vez que mueren, se despegan de la caja de cultivo. Esta característica se puede usar para obtener una cuantificación indirecta de la muerte celular o para encontrar diferencias en la viabilidad una vez que añadimos una condición determinada a nuestro experimento. Para poder detectar ese cambio en el comportamiento de las células se puede utilizar una tinción de aquellas células que permanezcan adheridas usando tinción con cristal de violeta en un cultivo. Si tras añadir una condición a un cultivo celular, observamos que la tinción de células es mayor o menor que un grupo control, podemos inferir diferentes propiedades de nuestra población celular de acuerdo con las condiciones particulares que estamos estudiando (Feoktistova et al., 2016).

Para utilizar la tinción como forma de medir la viabilidad celular, se hará un ensayo en el que se cultivará un número muy reducido de células en una caja de cultivo, con el fin de mantener a las células lo más aisladas entre sí como sea posible. Después de un periodo de incubación en el que se permite que las células se dividan y formen colonias, se hará la tinción con cristal de violeta. Si las células que tienen la condición añadida resultan más viables en condiciones adversas, podemos sugerir que la condición extra les confiere una viabilidad diferente en comparación a células control que no sobrevivieron de la misma manera.

Pasos:

- 1) En 2 ml de Medio Completo RPMI, se siembran 200 células por pozo, mediante diluciones en medio RPMI completo. En el conteo de células se deben de contar una célula por cuadrante.
- 2) Se dejan crecer durante una semana.
- 3) Se lavan las células con PBS 1X frío (4 °C).
- 4) Fijar con 2 ml de Metanol al 100% de grado molecular a (-20 °C), durante 10 minutos.
- 5) Se tiñen las células con una solución de cristal violeta e incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 6) Hacemos lavados con agua destilada para remover el exceso de tinción (3-5 lavados).
- 7) Removemos el líquido restante una vez finalizados los lavados y dejamos secar a temperatura ambiente.

El conteo de colonias se hará con la aplicación “Promega Colony Counter” para la plataforma iOS versión 18.2.1.

### Ensayo de proliferación con Resazurin

El reactivo Resazurin o “7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide sodium salt”, también conocido como “Alamar Blue”, es un colorante no tóxico de bajo peso molecular (Lavogina et al., 2022; Rampersad, 2012). Esta sal es permeable a través de las membranas celulares y puede ser reducida por el ambiente reductor de células vivas, además de ser soluble en medio de cultivo celular (Rampersad, 2012). Inicialmente, el resazurin es de un color azul no fluorescente, que mediante la acción de enzimas reductoras mitocondriales como la NADPH, FADH o NADH, así como también por citocromos, cambia a un estado reducido fluorescente y de color rosado (Page et al., 1993; Rampersad, 2012).

Este reactivo permite el diseño de experimentos funcionales en diferentes líneas celulares, ya que nos permite hacer mediciones precisas a través del tiempo, ya que no involucra la

lisis celular, es escalable y además puede ser medido con instrumentos basados en fluorescencia o absorbancia (Rampersad, 2012).

Se decidió el uso de mediciones de absorbancia para comparar el potencial reductor de células sembradas en microplacas, a las cuales se les mide la absorbancia del reactivo a 570 nm de longitud de onda (resazurin) y la absorbancia del reactivo reducido a 600 nm (resorufin), para de esta manera, comparar el nivel de proliferación entre nuestras distintas condiciones de estudio.

Pasos:

- 1) En una caja de 96 pozos, se siembran de 7500 a 8000 células.
- 2) Incubamos durante 48 horas.
- 3) Se aspira el medio con uso de la bomba de vacío.
- 4) Se agrega una mezcla de 10 µl de resazurin (PrestoBlue™) + 90 µl de Medio Simple por pozo.
- 5) Incubamos 1 hora y 30 minutos a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>.
- 6) Procedemos a medir absorbancia a 570 nm y 600 nm.

## Ensayo “Wound Healing”

La motilidad es una característica de las células vivas y la capacidad de migración de ellas está involucrada en procesos como el desarrollo embrionario; en el caso de enfermedades como el cáncer, la motilidad está relacionada con procesos como la metástasis o la inflamación. Además, una de las principales causas de muerte en el cáncer es la metástasis, mediante la cual el cáncer se propaga a través del cuerpo para llegar a otros órganos y continuar su invasión cancerígena, por lo que el estudio de la migración celular es de particular importancia en cualquier estudio de cáncer (Justus et al., 2014).

Una forma de estudiar la migración celular es mediante un ensayo “wound healing”, el cual es uno de los métodos más sencillos de llevar a cabo, permitiendo determinar la capacidad de migración o la respuesta a distintos fármacos de un conjunto de células mediante el seguimiento del cambio de superficie al rellenar una herida o “scracth” hecha en nuestra placa con células confluentes (Grada et al., 2017).

Para asegurar que nuestro experimento es una representación de la migración celular y que el espacio ocupado por las células en la herida no es por proliferación, se hace uso de la mitomicina c, la cual es un antibiótico del grupo de agentes alquiladores. Este reactivo inhibe la proliferación celular al hacer “crosslinking” o enlaces covalentes entre nucleótidos del DNA, específicamente en regiones con secuencias CpG. Esto significa que el DNA ya no

podrá ser sintetizado debido a estos enlaces y, por lo tanto, ya no se dará la salida de la fase G o entrada a la fase S del ciclo celular. De esta manera, al observar movimiento en nuestras células, descartamos que la proliferación sea una variable más.

Pasos:

- 1) En una caja de 12 pozos, sembramos 110 mil a 120 mil células en 1 ml de Medio Completo RPMI.
- 2) Incubamos 24 horas a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>.
- 3) Transfectamos la cantidad ideal según las células usadas.
- 4) Incubamos durante 48 horas a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>.
- 5) Lavamos con 500 µl de PBS 1X con especial cuidado.
- 6) Agregamos Medio Simple con Suero Fetal Bovino al 1% + 15 µg de Mitomicina C.
- 7) Incubamos una hora a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>.
- 8) Volvemos a agregar Medio Simple con Suero Fetal Bovino.
- 9) Hacemos uso de una punta de pipeta estéril para hacer un raspado o herida de manera recta mediante el uso de una regla. Este movimiento se hace sólo una vez.
- 10) Guardamos las células en la incubadora durante 30 minutos.
- 11) Ponemos Parafilm alrededor de la caja de células para poder tomar fotos en el microscopio.
- 12) Una vez tomada la foto al tiempo 0 horas, guardamos de nuevo en la incubadora y repetimos el paso anterior a las 24 horas y a las 48 horas.
- 13) Mediante uso de software integrado en el microscopio (Zeiss Zen Lite Microscopy Software), analizamos el área de la herida para obtener datos para análisis estadístico.

## Resultados

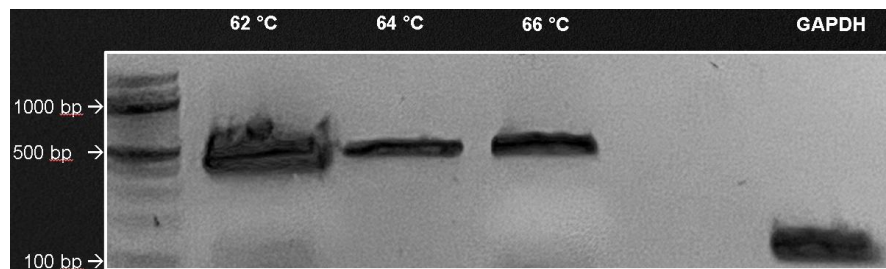
### Diseño de oligonucleótidos

Se utilizó la secuencia de nucleótidos reportada para *Homo sapiens* de S100A9 calcium binding protein A9 (S100A9), mRNA (NCBI Reference Sequence: NM\_002965.4), de la plataforma de “National Library of Medicine” del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos. Se escogieron dos secuencias de corte, una antes del primer codón, reconocida por la enzima BamHI (g/gatcc) y la segunda, EcoRV (gat/atc), después del último codón de la secuencia. Además, se utilizó la plataforma “Sequence Manipulation Suite”, para verificar que las secuencias de corte utilizadas no estén presentes dentro del marco de lectura del gen, para evitar secuencias truncadas. Ambas secuencias no están presentes dentro del gen y, por lo tanto, son adecuadas para seleccionarla de manera efectiva.

Además, se realizó el diseño de oligonucleótidos para detectar cuantitativamente la presencia del RNA mensajero de S100A9, basándonos en una porción más pequeña en la secuencia anterior, de 354 pares de bases, con el fin de medir el nivel de expresión del mensajero mediante qPCR.

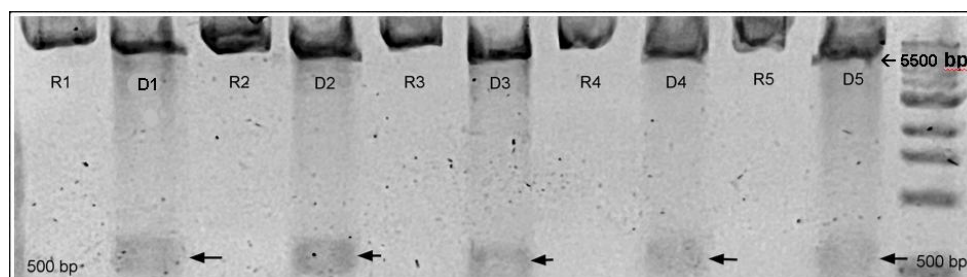
### Amplificación del gen S100A9

Se hizo un gradiente de temperatura de la reacción de polimerasa en cadena con el diseño de oligonucleótidos hecho para S100A9. Las temperaturas probadas fueron de 58°C hasta 66°C, de saltos de 2°C de temperatura entre cada amplificación. De estas, se observó que la amplificación ocurría encima de 60°C, por lo que se decidió hacer una reacción más para las temperaturas de 62°C, 64°C y 66°C, además de colocar un control cuantitativo de GAPDH (una sección más corta del gen completo) para asegurar la integridad del cDNA utilizado. Se decidió hacer la reacción de digestión y ligación del plásmido con el DNA de S100A9 obtenido de la purificación por kit de la banda de DNA correspondiente a la amplificación de 62°C.



**Figura 4:** Gel de Agarosa para observar gradiente de temperatura en amplificación por PCR de S100A9. El gen de S100A9 humano tiene una longitud de 576 pares de bases, el diseño de nuestros oligonucleótidos nos permite seleccionar sólo la región codificante de 489 pares de bases. Se incluye, además, la presencia de qGAPDH como control de integridad del cDNA.

Una vez obtenido el plásmido, se procedió a transformar una cepa de células competentes DH5- $\alpha$  para posteriormente, sembrar en una placa de medio con antibiótico, permitiendo seleccionar sólo aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido con el gen. Además de esto, una vez incubadas las bacterias y formadas las colonias, se seleccionaron 5 colonias aisladas para hacerles una reacción de mini-prep por kit para purificar su DNA y secuenciarlo. Se realizó también una segunda reacción de digestión para verificar nuestro gen en presencia de las enzimas de restricción que se escogieron en el diseño de oligonucleótidos inicial.



**Figura 5:** Gel de Agarosa para observar el inserto de S100A9 digerido junto al plásmido completo sin digerir. R#: Plásmido superenrollado; D#: Digestión del Inserto.

El paso de la secuenciación del inserto cumple la función de verificar que la secuencia que ha sido insertada en nuestro plásmido sea lo más idéntica posible a nuestro gen de estudio reportado en una base de datos oficial. Si, tras realizar un alineamiento de la secuencia reportada por secuenciación del plásmido con la secuencia consenso, se reporta una

coincidencia de 100%, entonces será la ideal para continuar con los experimentos de viabilidad celular.

Job Title

reference DNA gene

RID

[F41Z5WCP114](#)
Search expires on 09/25 08:29 am
[Download All](#)

Program

Blast 2 sequences [Citation](#)

Query ID

lcl|Query\_1170053 (dna)

Query Descr

reference DNA gene

Query Length

573

Subject ID

lcl|Query\_1170055 and 4 more subject(s) (dna)

Subject Descr

[See details](#)

Subject Length

5450

Filter Results

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100

☒ select all

5 sequences selected

[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

|                                     | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession     |
|-------------------------------------|-------------|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | s1008       |                 | 922       | 922         | 87%         | 0.0     | 100.00%    | 1241     | Query_1170058 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | s1004       |                 | 915       | 915         | 87%         | 0.0     | 99.80%     | 1202     | Query_1170057 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | s10010      |                 | 915       | 915         | 87%         | 0.0     | 99.80%     | 928      | Query_1170055 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | s1003       |                 | 911       | 911         | 87%         | 0.0     | 99.60%     | 1242     | Query_1170056 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | s1009       |                 | 909       | 909         | 87%         | 0.0     | 99.60%     | 837      | Query_1170059 |

**Figura 6:** Captura de la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), donde se muestra el nivel de identidad de cinco muestras diferentes.

s1008

Sequence ID: Query\_1170058 Length: 1241 Number of Matches: 1

Range 1: 24 to 522 [Graphics](#) [▼ Next Match ▲](#)

| Score         | Expect                                                       | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| 922 bits(499) | 0.0                                                          | 499/499(100%) | 0/499(0%) | Plus/Plus |
| Query 44      | ATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTGGAACGCAACATAGAGACCATCATCAACACCTTCCAC | 103           |           |           |
| Sbjct 24      | ATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTGGAACGCAACATAGAGACCATCATCAACACCTTCCAC | 83            |           |           |
| Query 104     | CAATACTCTGTGAAGCTGGGGCACCCAGACACCCTGAACCAGGGGGAATTCAAAGAGCTG | 163           |           |           |
| Sbjct 84      | CAATACTCTGTGAAGCTGGGGCACCCAGACACCCTGAACCAGGGGGAATTCAAAGAGCTG | 143           |           |           |
| Query 164     | GTGCGAAAAGATCTGCAAAATTTTCTCAAGAAGGAGAATAAGAATGAAAAGGTCATAGAA | 223           |           |           |
| Sbjct 144     | GTGCGAAAAGATCTGCAAAATTTTCTCAAGAAGGAGAATAAGAATGAAAAGGTCATAGAA | 203           |           |           |
| Query 224     | CACATCATGGAGGACCTGGACACAAATGCAGACAAGCAGCTGAGCTTCGAGGAGTTCATC | 283           |           |           |
| Sbjct 204     | CACATCATGGAGGACCTGGACACAAATGCAGACAAGCAGCTGAGCTTCGAGGAGTTCATC | 263           |           |           |
| Query 284     | ATGCTGATGGCGAGGCTAACCTGGGCCTCCCACGAGAAGATGCACGAGGGTGACGAGGGC | 343           |           |           |
| Sbjct 264     | ATGCTGATGGCGAGGCTAACCTGGGCCTCCCACGAGAAGATGCACGAGGGTGACGAGGGC | 323           |           |           |
| Query 344     | CCTGGCCACCACCATAAGCCAGGCCTCGGGGAGGGGCACCCCTAAGACCACAGTGGCCAA | 403           |           |           |
| Sbjct 324     | CCTGGCCACCACCATAAGCCAGGCCTCGGGGAGGGGCACCCCTAAGACCACAGTGGCCAA | 383           |           |           |
| Query 404     | GATCACAGTGGCCACGGCCACGGCCACAGTCATGGTGGCCACGGCCACAGCCACTAATCA | 463           |           |           |
| Sbjct 384     | GATCACAGTGGCCACGGCCACGGCCACAGTCATGGTGGCCACGGCCACAGCCACTAATCA | 443           |           |           |
| Query 464     | GGAGGCCAGGCCACCCTGCCTCTACCCAACCAGGGCCCCGGGGCCTGTTATGTCAAAGT  | 523           |           |           |
| Sbjct 444     | GGAGGCCAGGCCACCCTGCCTCTACCCAACCAGGGCCCCGGGGCCTGTTATGTCAAAGT  | 503           |           |           |
| Query 524     | TCTTGGCTGTGGGGCTAGG                                          | 542           |           |           |
| Sbjct 504     | TCTTGGCTGTGGGGCTAGG                                          | 522           |           |           |

**Figura 7:** Captura de la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), donde se muestra la comparación entre una secuencia "Query" (el resultado de nuestra secuenciación) comparada con una secuencia Subject, que en este caso es el gen de Homo sapiens S100A9 calcium binding protein A9 (S100A9), mRNA, obtenida de la base de datos de GenBank del National Library of Medicine. Se muestra una coincidencia del 100% entre ambas.

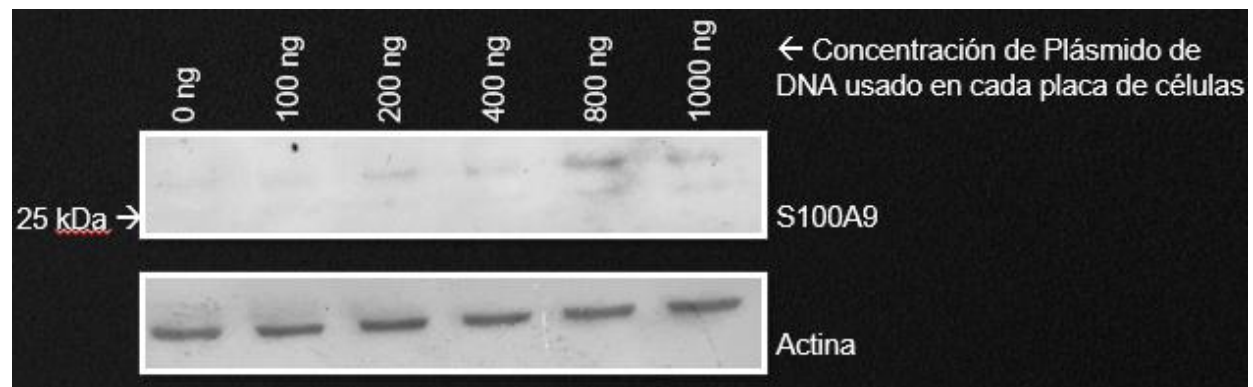
## Experimentos de expresión

Para los experimentos en células, se comenzó con la prueba de expresión del plásmido recombinante del gen S100A9 en dos líneas celulares. Una de ellas es la línea celular H1299, la cual es una línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas que no

expresa la proteína supresora tumoral p53; además de la línea celular H1299 RB  $-/-$ , la cual fue diseñada mediante tecnología de CRISP-R/Cas para obtener una knockout del gen *RB1* que codifica para la proteína RB.

El diseño de este experimento se basa en el cultivo celular en seis pozos de una placa de cultivo, en los cuáles añadimos la misma cantidad de células para una vez llegadas a una confluencia ideal, hacer transfección del plásmido con lipofectamina en concentraciones en incremento. Una vez pasadas las 48 horas, lisamos las células y procesamos las muestras para hacer un revelado mediante SDS page y Western Blot.

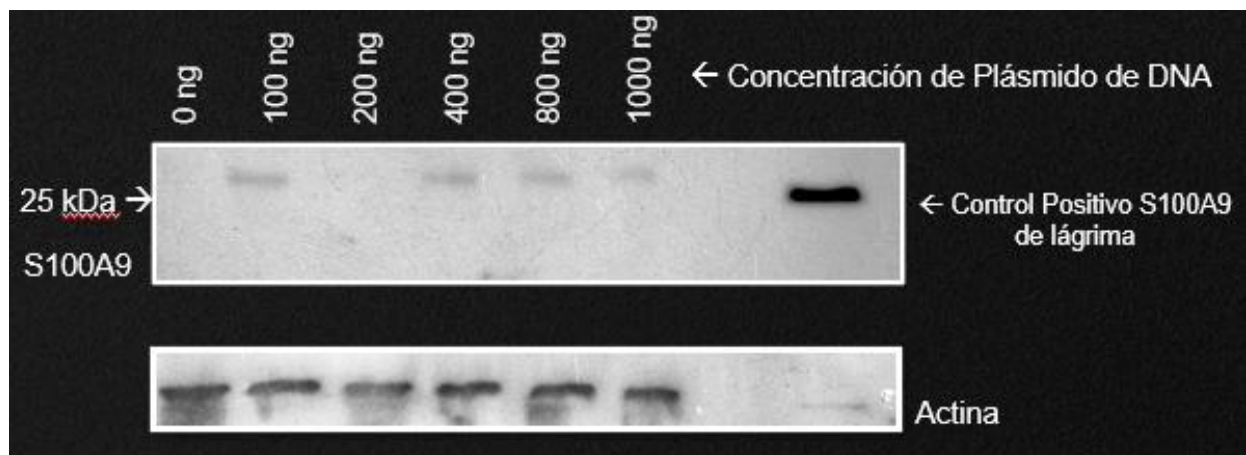
En el caso de la línea celular H1299 Wild Type, se obtuvo el siguiente Western Blot:



**Figura 8:** Western Blot para observar la expresión del plásmido de S100A9 en la línea celular H1299 WT.

En este ensayo se pudo observar el incremento de la expresión de S100A9 conforme se aumenta la concentración de DNA de S100A9, hasta llegar a un pico máximo de expresión en 800 ng de DNA transfectado. En el último carril, la expresión disminuye. Además, observamos una expresión estable de la proteína constitutiva actina entre muestras, descartando errores en la transfección de DNA.

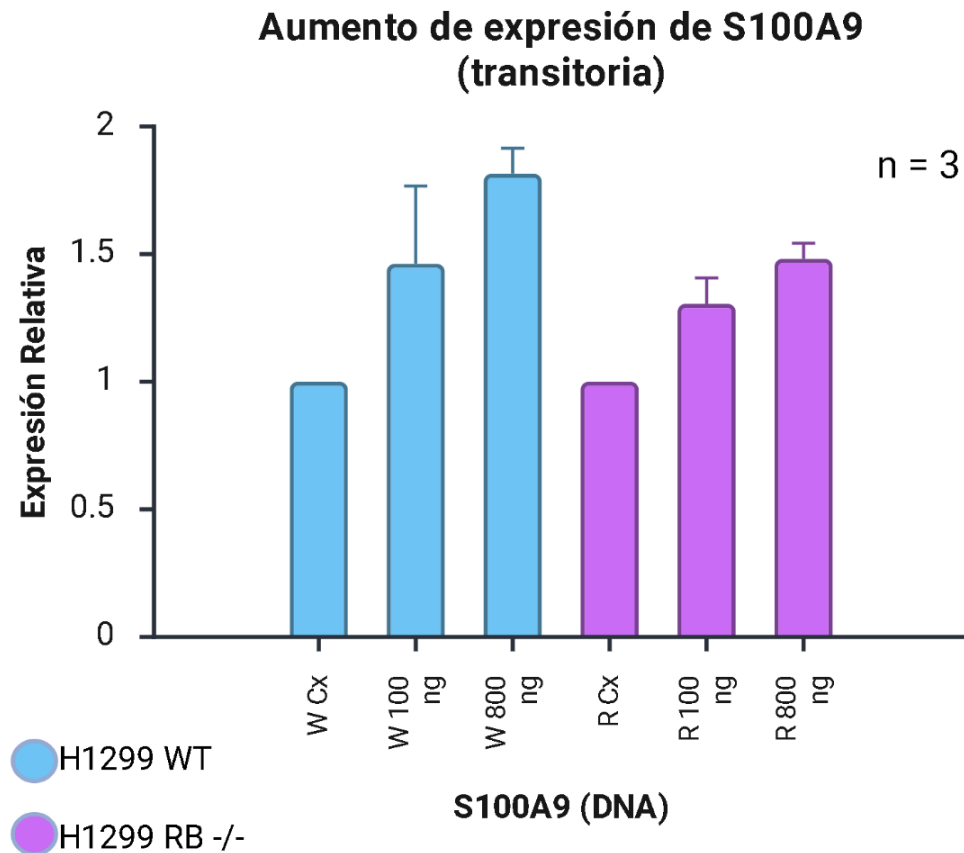
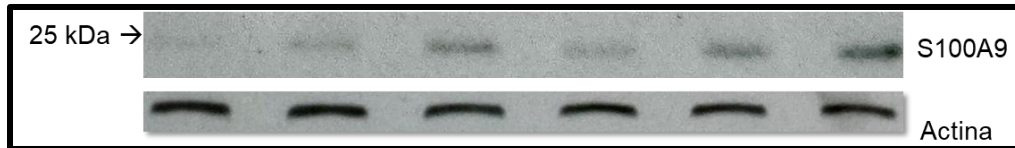
En el caso de la línea celular H1299 RB knockout, se obtuvo el siguiente Western Blot:



**Figura 9:** Western Blot para observar la expresión del plásmido de S100A9 en la línea celular H1299 RB knockout.

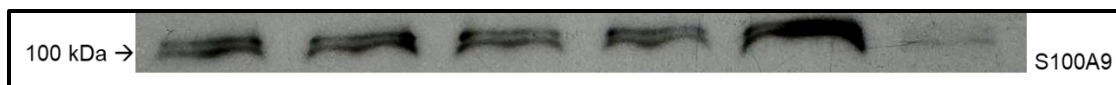
Para este ensayo se pudo observar el resultado de la transfección del DNA de S100A9. En 100, 400 y 800 ng se observa un nivel similar de expresión, para el caso de 200 ng de DNA no se observa la expresión de la proteína y en el caso de 1000 ng, se percibe una menor cantidad de expresión. En este experimento se decidió añadir un control positivo de S100A9 purificado de lágrima para confirmar el peso de la proteína.

Posterior a esto, se decidió que la expresión de S100A9 en 100 ng y 800 ng serían considerados como “poca expresión” y “sobrexpresión”, respectivamente. Se procedió a hacer la confirmación en ambas líneas celulares obteniendo el siguiente resultado:

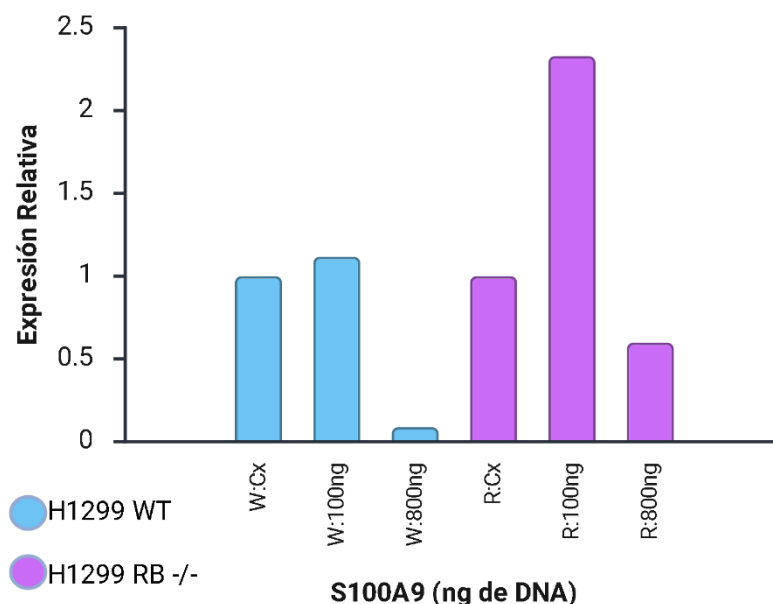


**Figura 10:** Western Blot de la expresión de S100A9 en las líneas celulares H1299 WT y RB<sup>-/-</sup>. Se observa una mayor expresión entre las condiciones seleccionadas y, además, el resultado sugiere una mayor expresión de S100A9 basal en la línea celular deficiente de RB en comparación la WT.

De la muestra anterior, se recuperó el medio en el que se incubaron las células para someterlo a un proceso de concentración con centricones. Se usaron centricones de 10 kDa para filtrar todas las proteínas menores a ese tamaño y concentrar las proteínas de mayor peso en un volumen menor. Si nuestra proteína tiene un peso reportado de 14 kDa, esperamos observarla al revelarla en un western blot, por lo tanto se obtuvo el siguiente resultado:



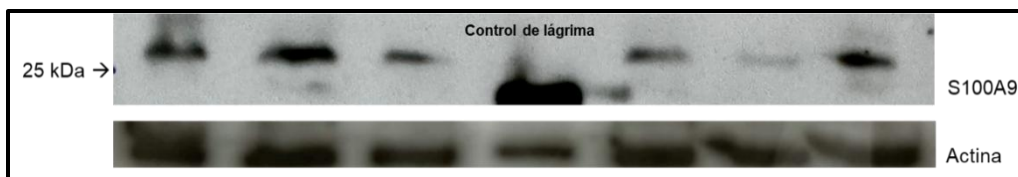
### Expresión de S100A9 en Medio RPMI



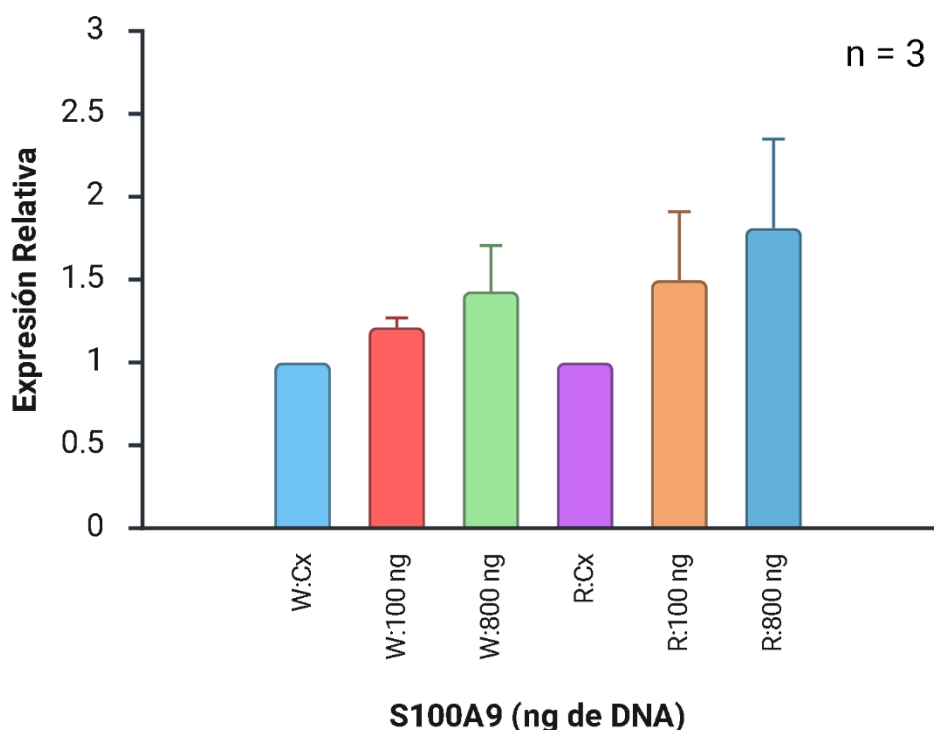
**Figura 11:** Western Blot de S100A9 hecho a partir del medio RPMI completo, recuperado y concentrado después de incubar ambas líneas celulares con las respectivas concentraciones de S100A9 para un experimento de expresión.

Estos resultados sugieren que hay un mecanismo que modifica el peso de nuestra proteína detectada en 17 kDa como monómero (o 25 kDa como homodímero), a aproximadamente 100 kDa. No se hicieron más pruebas para confirmar este mecanismo.

Posteriormente, se decidió transfectar las condiciones de 100 ng de plásmido y 800 ng de plásmido en presencia del antibiótico G418 para ambas líneas celulares. Debido a que el plásmido pcDNA 3.1 contiene un casete de expresión de resistencia a neomicina y dado que G418 es un antibiótico derivado de la neomicina, sólo aquellas células que hayan asimilado el plásmido serán viables. De esta manera, mediante un tratamiento prolongado de las células con el antibiótico, se consigue una línea celular estable. Para confirmar esto, se hizo el siguiente Western Blot:



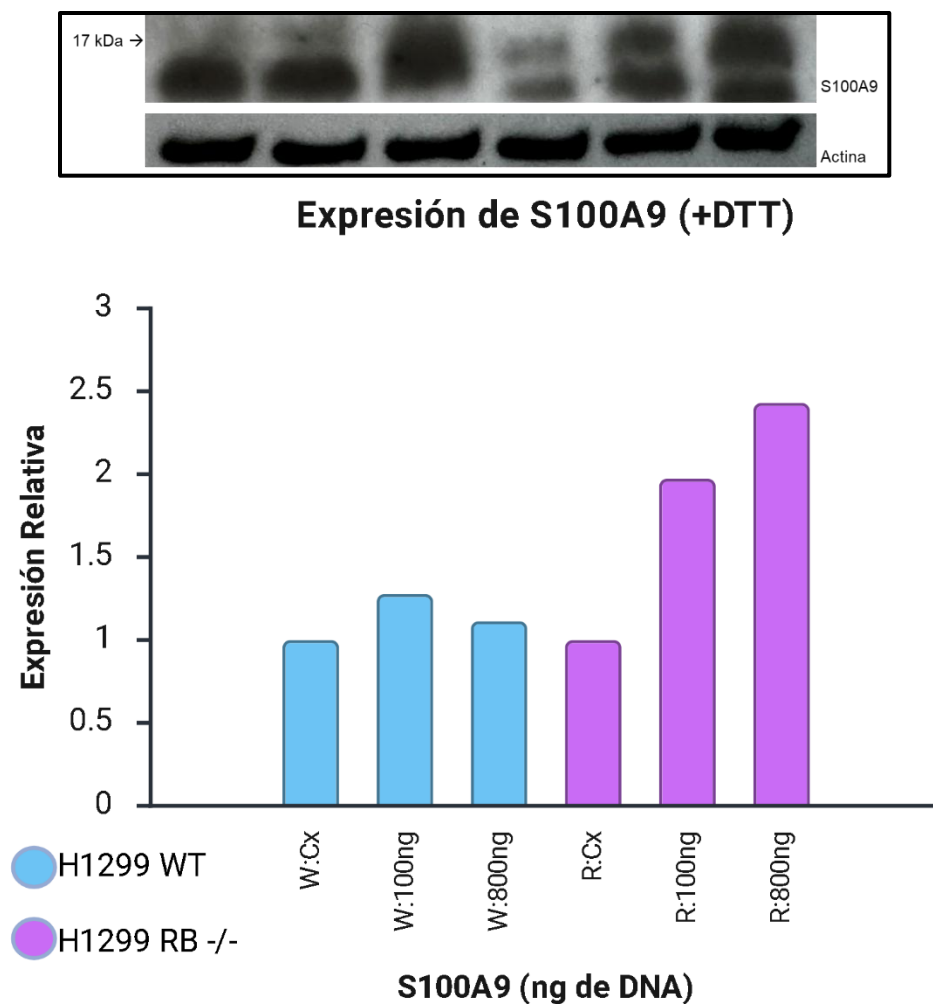
### Aumento de expresión de S100A9 (estables)



**Figura 12:** Western blot S100A9 de líneas celulares estables con G418. Se muestra un control positivo de proteína de lágrima.

El resultado anterior, confirma la correcta transfección y posterior estabilización de la expresión de S100A9 en ambas líneas celulares.

Debido a la naturaleza de interacción de S100A9 consigo misma o con otras proteínas de la familia S100, se decidió incubar las muestras de proteína de los experimentos de expresión en concentraciones más altas del agente reductor DTT (dithiothreitol), el cual rompe enlaces disulfuro que se forman entre las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, para observar el efecto en su migración por peso, obteniendo el siguiente resultado:

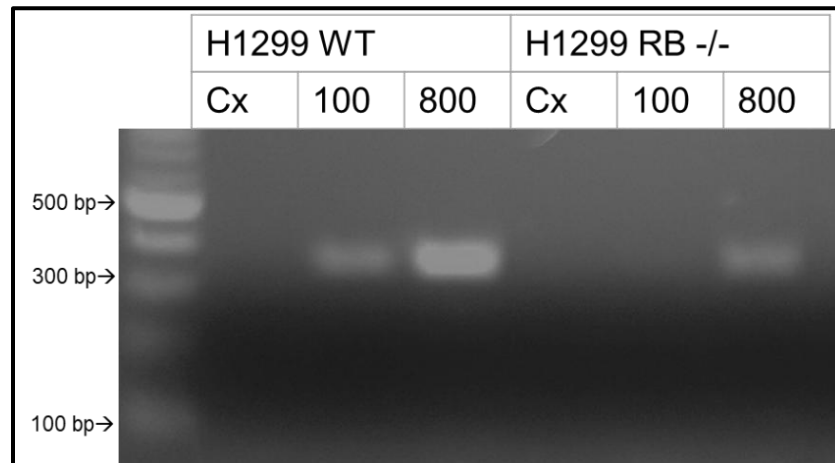


**Figura 13:** Western Blot de S100A9 hecho a partir de muestras tratadas con buffer de mayor concentración de DTT, para causar la separación del dímero de S100A9 y observar la migración de la proteína individual (peso relativo de S100A9: 14 kDa).

Se detectó la proteína S100A9 en un peso de aproximadamente 15-17 kDa, lo que confirma que el aumento de condiciones reductoras mediante el incremento del reactivo DTT, permite la visualización de la proteína S100A9 completamente desnaturalizada. Esto sugiere que los dímeros de S100A9 contienen altas cantidades de enlaces disulfuro por lo que es necesario estandarizar las concentraciones de DTT ideales en el buffer de proteína para observar a S100A9 en diferentes conformaciones proteicas.

## Experimento de qPCR

Además de observar la expresión del gen a nivel de proteína, se hizo uso de los oligos cuantitativos para observar la expresión a nivel mensajero del gen de S100A9. Tras sembrar células en cajas de 12 pozos, obtener su RNA mediante trizol y posterior conversión a cDNA mediante retro transcripción, se hicieron reacciones de PCR en cada una de las condiciones estudiadas: H1299 WT (Cx, 100 ng y 800 ng) y H1299 RB <sup>-/-</sup> (Cx, 100 ng y 800 ng). Se obtuvo el siguiente resultado:

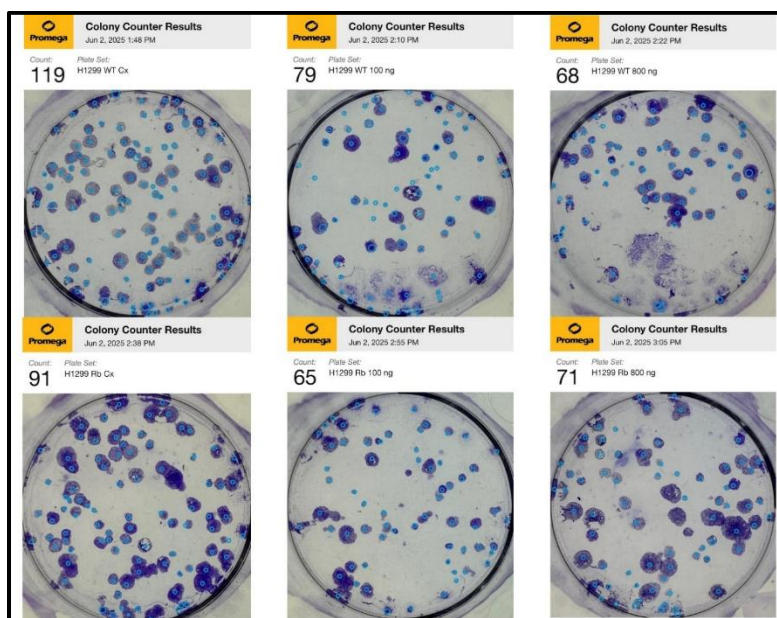


**Figura 14:** Gel de agarosa para ver la expresión del mRNA de S100A9 en ambas líneas celulares estables.

Se observó la expresión a nivel de mensajero en las condiciones antes mencionadas, observando que en las condiciones control de ambas líneas celulares (H1299 WT y RB -/-) la expresión de S100A9 mRNA es nula. Para el caso de la línea WT, se observa que la expresión de S100A9 100 ng de DNA, hay un nivel de expresión mayor que en el control y en el caso de S100A9 800 ng de DNA, hay un nivel aún mayor de expresión que en ambas condiciones. Esto indica una transcripción del plásmido acorde a la cantidad transfectada en las condiciones. Para el caso de la línea celular H1299 RB -/-, se observa una ligera expresión del mensajero en S100A9 100 ng de DNA por encima de la expresión basal, pero siendo más notoria la expresión de la condición S100A9 800 ng de DNA en comparación al control y a 100 ng. Esto indica una transcripción acorde a la cantidad de plásmido transfectado en cada condición. Este experimento funciona como una confirmación de la transfección del plásmido estudiado a nivel de RNA mensajero y es un complemento para los ensayos de expresión de proteína.

### Experimentos de viabilidad (Tinción Violeta)

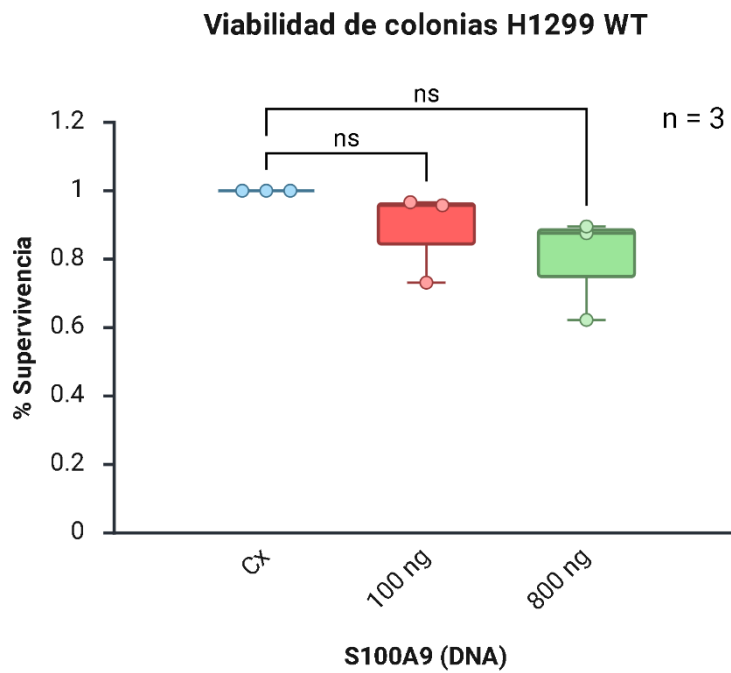
Se decidió continuar con los ensayos de viabilidad, proliferación y migración con las condiciones previamente establecidas. Comenzando con ensayos de viabilidad, de los cuales, tras una serie de experimentos para determinar el tiempo de mejor incubado para observar colonias se obtuvieron los siguientes resultados:



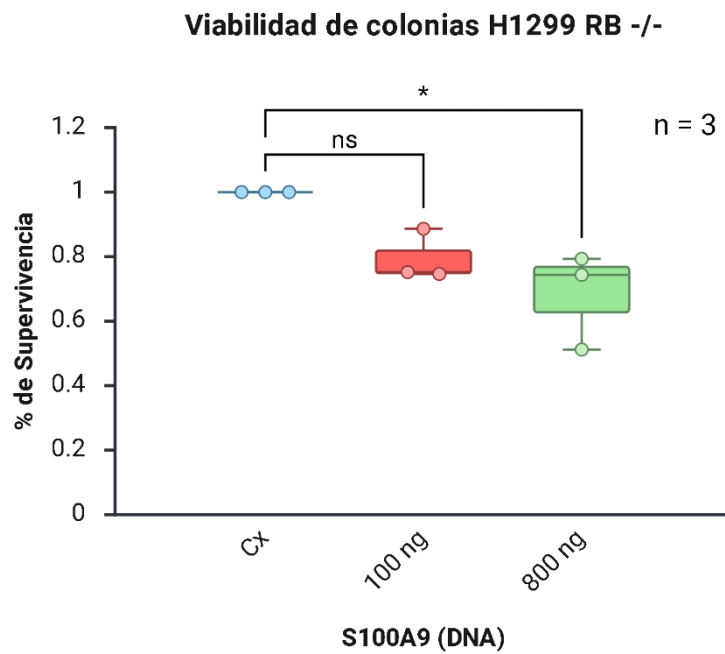
**Figura 15:** imagen representativa de las colonias teñidas con azul violeta. Se muestra el conteo, la línea celular (H1299 WT y RB -/-) y la condición a la que corresponden.

Con el uso de un software de conteo de colonias, se procesan las fotos de las placas con las colonias teñidas con azul violeta. En este caso, podemos observar cómo el número de colonias de la línea celular H1299 WT disminuye con el aumento de S100A9 transfectado. En el caso de la línea celular H1299 RB -/-, observamos un resultado similar en el que las colonias parecen disminuir su cantidad dependiendo del nivel de expresión de S100A9.

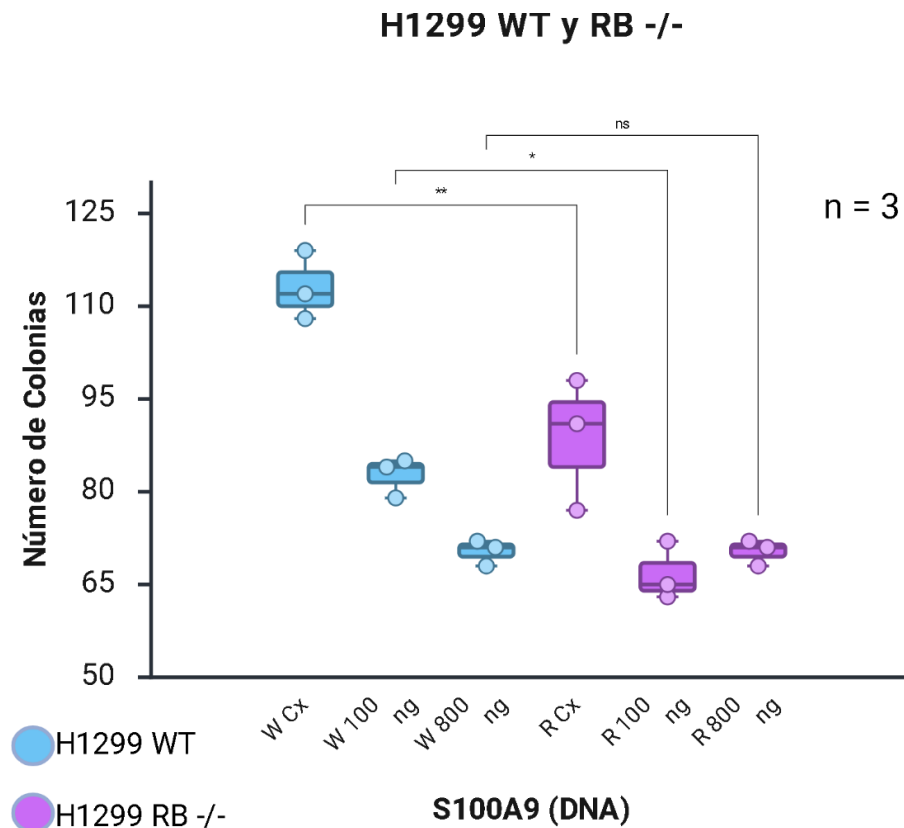
Una vez hecho el análisis estadístico del triplicado obtuvimos los siguientes resultados:



**Figura 16:** Gráfica de la línea celular H1299 WT que muestra las diferencias entre el porcentaje de supervivencia en colonias en proporción a S100A9.



**Figura 17:** Gráfica de la línea celular H1299 RB -/- que muestra las diferencias entre el porcentaje de supervivencia en colonias en proporción a S100A9.



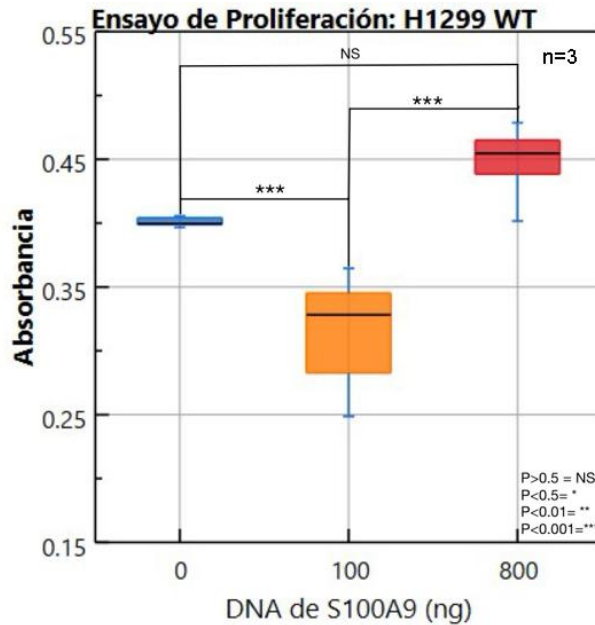
**Figura 18:** Gráfica de comparación de números de colonias entre condiciones de las líneas celulares H1299 WT y H1299 RB -/-.

Para el caso de la línea celular H1299 WT, observamos que hay una tendencia a disminuir el porcentaje de supervivencia respecto al control, aunque la diferencia no es significativa. Para el caso de H1299 RB -/-, existe una diferencia entre porcentaje de supervivencia entre las células transfectadas con 800 ng de S100A9 y el control, pero no hay diferencia significativa entre la condición control y 100 ng de S100A9.

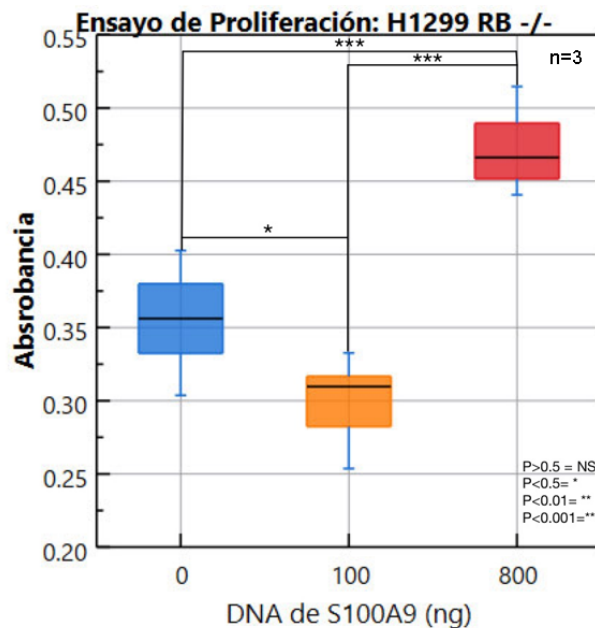
Sin embargo, si comparamos el número de colonias entre líneas celulares, hay diferencia significativa entre las condiciones control y 100 ng. Esto podría implicar que RB tiene un papel en la supervivencia dependiente de la concentración de la expresión de S100A9.

### Ensayos de Proliferación (resazurin)

Posteriormente, se hicieron ensayos de proliferación mediante ensayo colorimétrico con resazurin. Tras un periodo de incubación del reactivo con las células, se midió el cambio de color del reactivo en un espectrofotómetro, obteniendo los siguientes resultados:



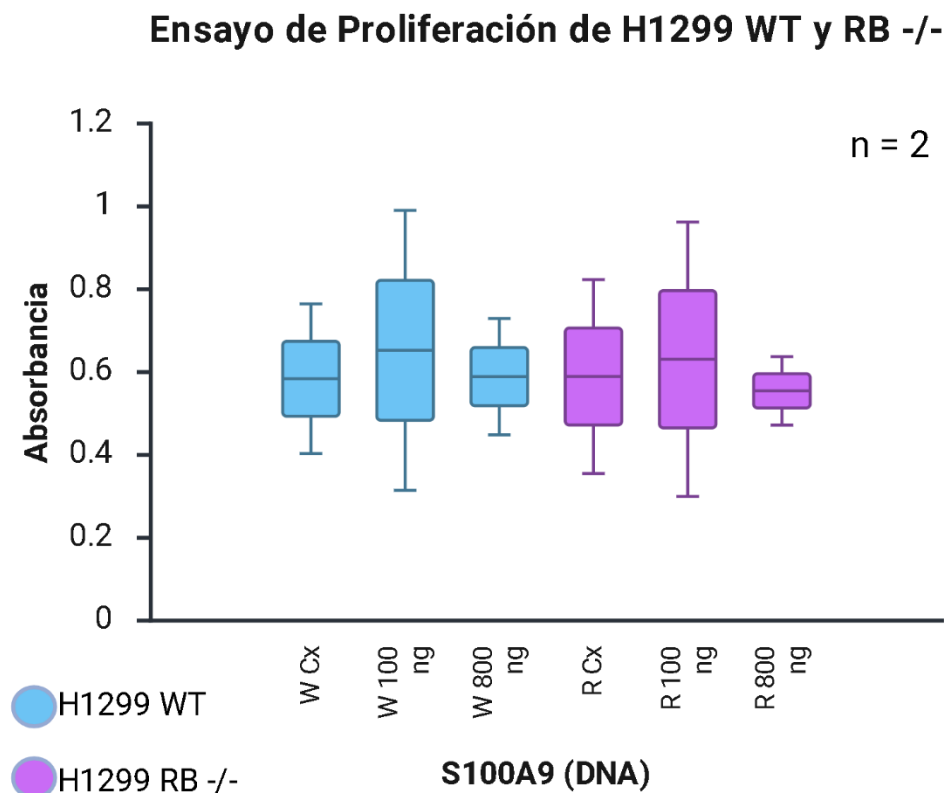
**Figura 19:** Gráfica de la línea celular H1299 WT que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9.



**Figura 20:** Gráfica de la línea celular H1299 RB -/- que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9.

Para el caso de la línea celular H1299 WT, observamos que la proliferación es distinta entre las condiciones control y 100 ng de S100A9, así como entre la de 100 ng y 800 ng. En el caso de 100 ng observamos una disminución en la proliferación respecto al control, pero al comparar la proliferación de 100 ng con 800 ng, la diferencia es mayor. Para el caso de la línea celular H1299 RB -/-, la diferencia de proliferación es distinta entre todas las

condiciones, aunque observamos el mismo comportamiento que la línea WT, ya que a 100 ng de S100A9, la proliferación disminuye y a 800 ng aumenta en gran proporción. Además de esto, se compararon las diferencias entre líneas celulares, obteniendo el siguiente resultado:



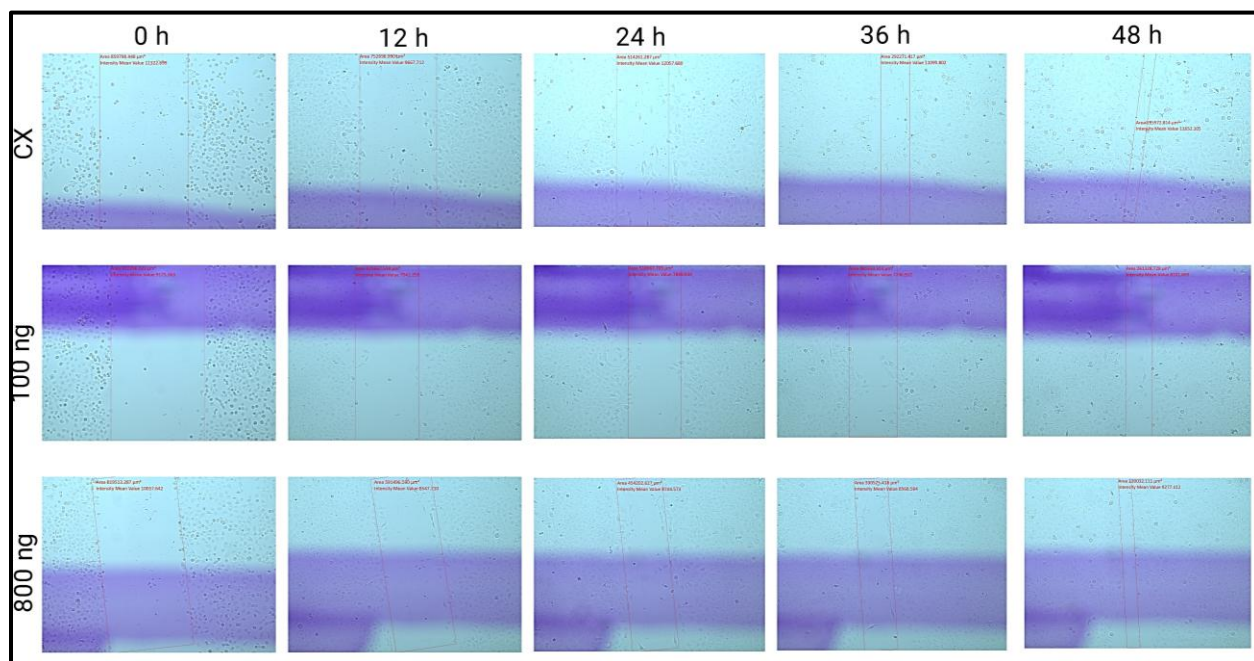
**Figura 21:** Gráfica de las líneas celulares H1299 WT y H1299 RB -/- que muestra las diferencias entre la absorbancia en función de la cantidad de S100A9. No existe relevancia significativa entre grupos.

Estos resultados indican que no hay evidencia suficiente para sugerir una diferencia entre H1299 WT y H1299 RB -/-, por lo que RB no está implicado en este efecto. A pesar de esto, el efecto que tiene S100A9 en ambas líneas celulares sugiere que su baja expresión causa una inhibición de la proliferación (o induce la muerte celular) en comparación con la condición control. Además, este efecto es dependiente de la concentración de S100A9, ya que la alta expresión de S100A9 incrementa la proliferación en ambas líneas celulares.

### Ensayos de Migración (Wound Healing)

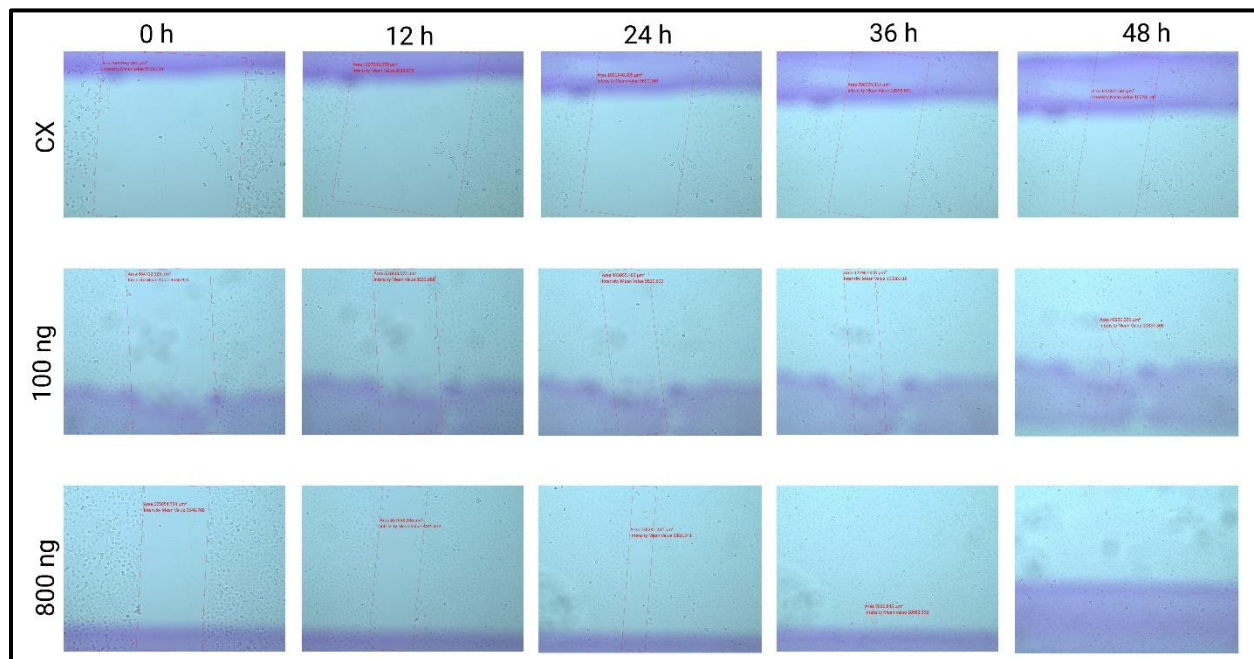
Después se procedió a realizar los ensayos de migración. Tras varias pruebas, se determinó el tiempo adecuado para lograr una confluencia ideal para que el efecto de la herida fuera notable y cuantificable, además de determinar un tiempo ideal de toma de evidencia fotográfica para observar los efectos, obteniendo los siguientes resultados:

## H1299 WT

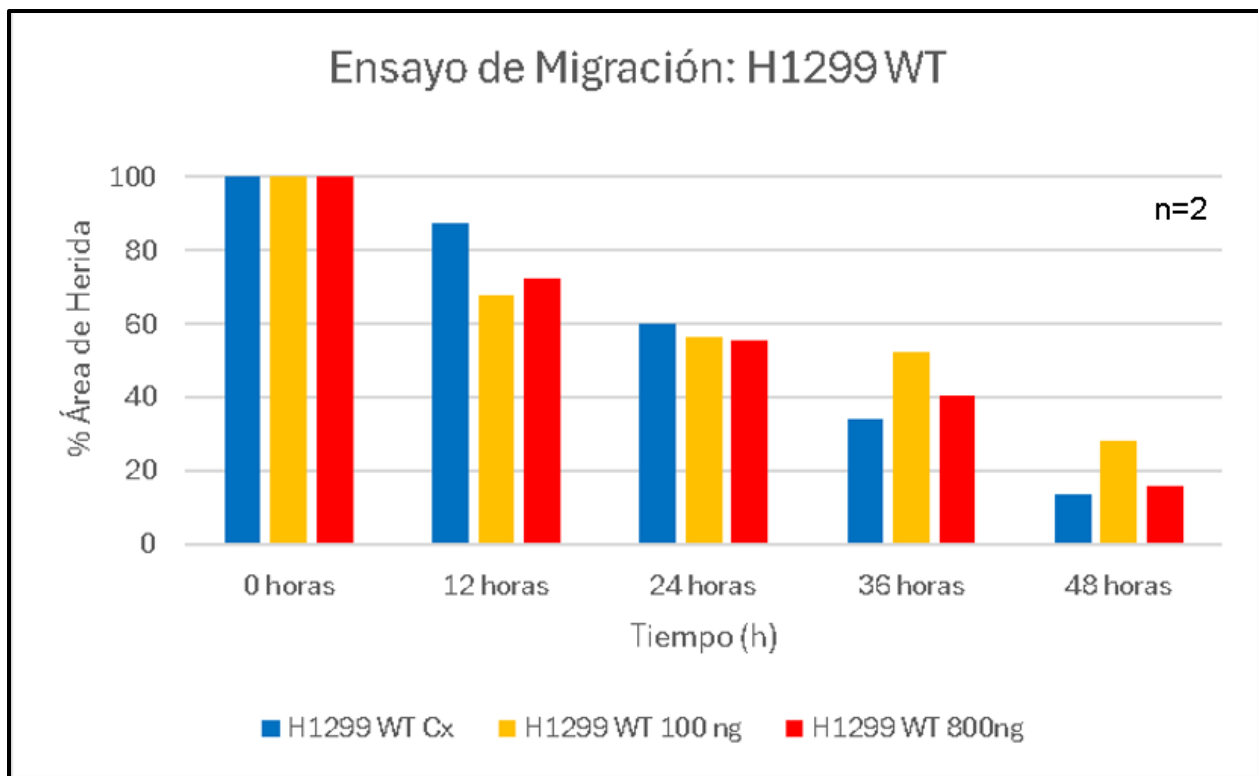


**Figura 22:** Imágenes representativas del proceso de migración celular de H1299 WT. Se muestran líneas rojas que delimitan el área estimada junto con el progreso en el tiempo de cada condición (Cx, 100 ng y 800 ng).

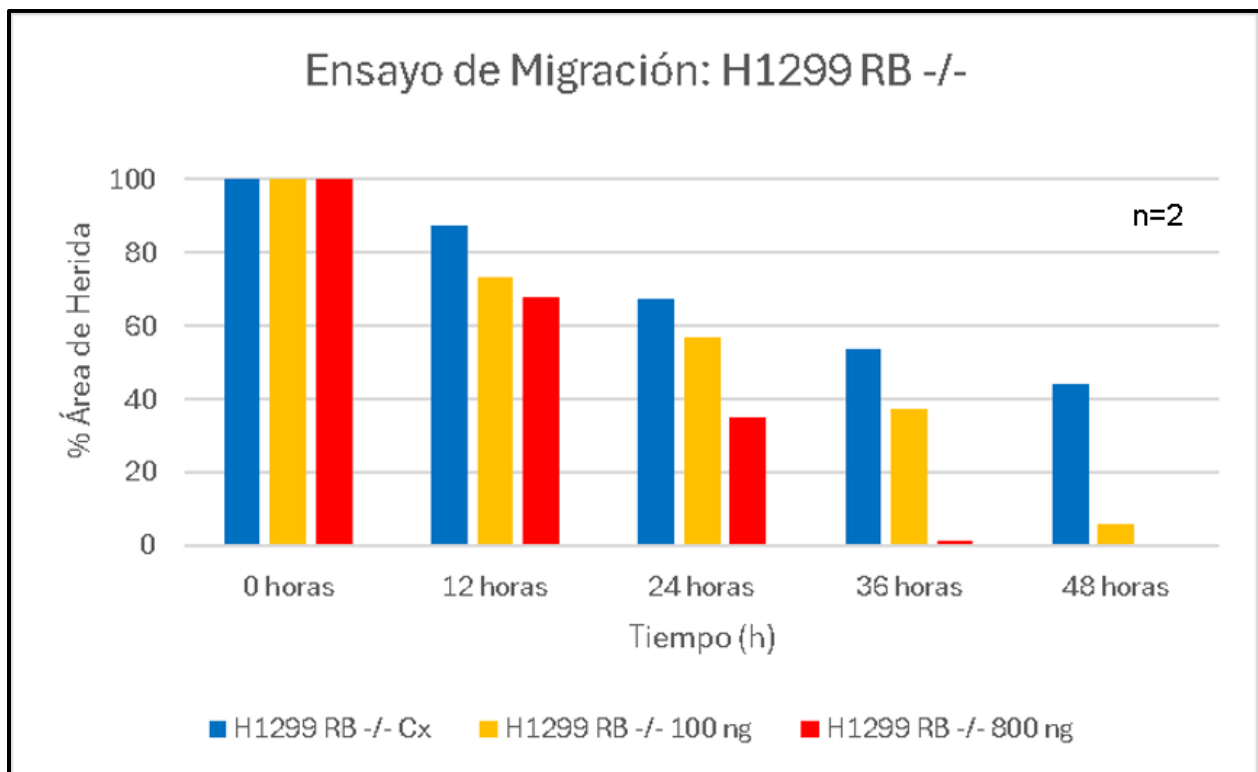
## H1299 RB -/-



**Figura 23:** Imágenes representativas del proceso de migración celular de H1299 RB -/-. Se muestran líneas rojas que delimitan el área estimada junto con el progreso en el tiempo de cada condición (Cx, 100 ng y 800 ng).

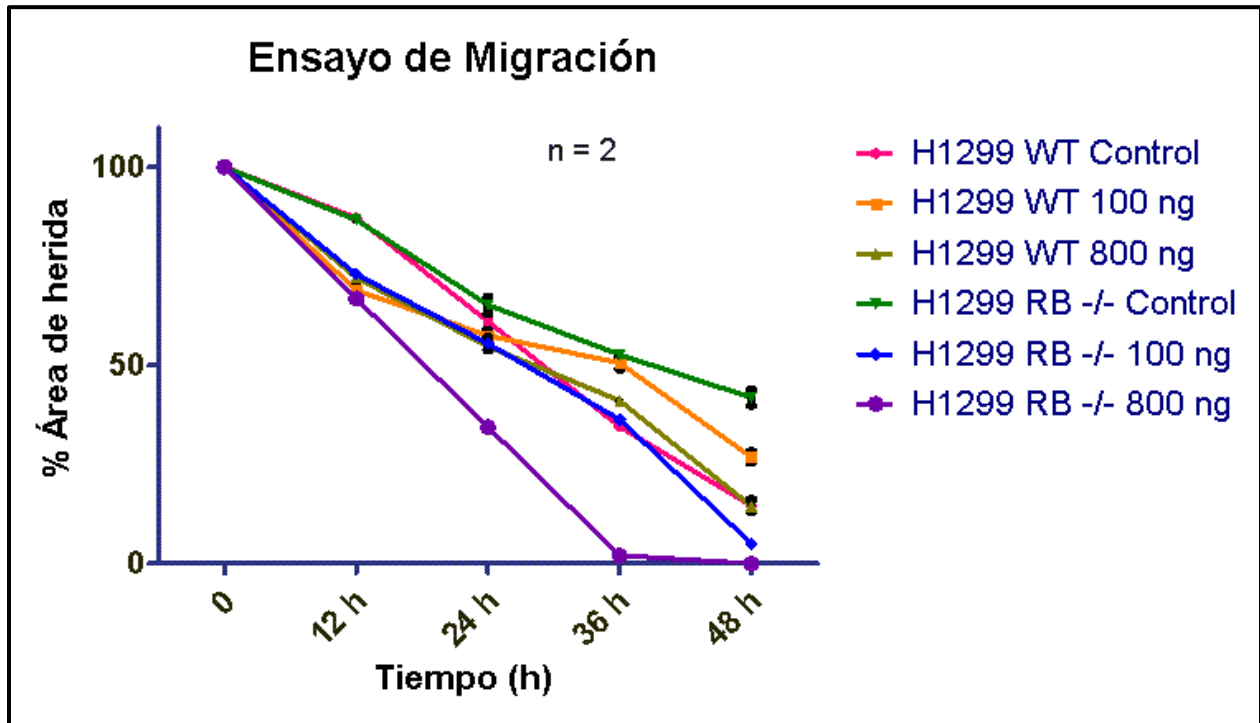


**Figura 24:** Gráfica del porcentaje de disminución del área respecto al T=0 de la línea celular H1299 WT.



**Figura 25:** Gráfica del porcentaje de disminución del área respecto al T=0 de la línea celular H1299 RB-/-.

Tras realizar un duplicado del experimento de migración se obtuvo la siguiente gráfica:



**Figura 26:** Gráfica del porcentaje de cierre de la herida respecto al T=0 de ambas líneas celulares. Se puede observar una diferencia significativa entre la migración de H1299 RB -/- control en comparación con la H1299 Rb -/- 800 ng.

Para el caso de la línea celular H1299 WT, la migración parece no cambiar entre condiciones de S100A9 conforme pasa el tiempo. Pero para el caso de la línea celular H1299 RB-/-, la migración parece ser más rápida conforme aumentamos los niveles de S100A9. Estos resultados podrían implicar que el efecto de S100A9 sobre la migración parece ser modulado por la presencia o ausencia de RB.

El conjunto de resultados mostrados podrían ayudar a explicar un fenotipo maligno de Retinoblastoma en el que la sobreexpresión de S100A9 (en pacientes con retinoblastoma mostrado en los antecedentes), junto con la ausencia de la proteína RB, potencien el efecto proliferativo y migratorio de este tipo de cáncer. Sin embargo, es necesario repetir este experimento y complementar este hallazgo con otros experimentos tales como la coexpresión de S100A9 con RB así como experimentos de inmunofluorescencia para indagar en la localización de la proteína y en el mecanismo que está detrás de estos comportamientos.

## Discusión:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el rol molecular y funcional de S100A9 en procesos celulares asociados con la progresión tumoral, incluyendo proliferación, migración y viabilidad, utilizando las líneas celulares H1299 Wild Type (WT) y H1299 RB  $-/-$ , carentes del gen *RB1*. La expresión del gen S100A9 fue confirmada tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel proteico, validando el diseño del plásmido recombinante y su correcta transfección.

El proceso de clonación y validación confirmó la correcta inserción del gen S100A9 en el vector de expresión pcDNA3.1, mostrando una coincidencia del 100% con la secuencia reportada en la base de datos GenBank para *Homo sapiens* S100A9 mRNA (NCBI Reference Sequence: NM\_002965.4). Este paso fue crucial para determinar la exactitud de la secuencia insertada y garantizar que los efectos observados en las líneas celulares correspondan a la proteína S100A9 nativa y no a una versión truncada o mutada. Adicionalmente, la confirmación de expresión proteica mediante Western Blot demostró que el incremento en la cantidad de DNA transfectado se correlaciona con un aumento de la expresión proteica, hasta alcanzar un pico máximo en la condición de 800 ng. Esto concuerda con reportes previos de expresión dependiente de dosis en genes regulados por promotores fuertes como CMV (Geisse & Fux, 2009; Kaufman, 2000).

En la línea celular H1299 RB  $-/-$  se observó una expresión basal mayor de S100A9 comparada con la línea H1299 WT, sugiriendo una posible relación regulatoria entre RB y S100A9. Estudios previos han descrito que la pérdida de RB induce un cambio transcripcional que afecta la expresión de genes proinflamatorios y de respuesta al estrés, entre los cuáles S100A9 podría estar actuando como posible regulador (Dyson, 2016; Wolf et al., 2025), lo cual podría explicar el incremento de S100A9 en células deficientes de RB. Esta observación destaca la necesidad de explorar la relación entre la ausencia de RB y la regulación de proteínas S100 en el contexto oncogénico del retinoblastoma.

### S100A9 y proliferación celular

Los ensayos de proliferación mediante resazurin mostraron que la baja expresión de S100A9 (100 ng de DNA) conduce a una disminución de la proliferación en comparación con el control, mientras que la sobreexpresión (800 ng de DNA) incrementa la proliferación en ambas líneas celulares. Este efecto dependiente de la concentración es consistente con reportes previos que demuestran que S100A9, tanto en su forma de homodimérica como en heterodímero con S100A8, activa vías de señalización proliferativa a través del receptor RAGE, promoviendo la activación de vías como las MAPK, NF- $\kappa$ B e Hippo/YAP (Chang et al., 2016; Y. Li et al., 2019; Rigitacciolo et al., 2022).

De manera complementaria, en un artículo reciente del 31 de Octubre del 2025, Charan et al. (2025) demostraron que la sobreexpresión de S100A9 en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) induce una reprogramación metabólica y un microambiente inmunosupresor, lo cual favorece la supervivencia tumoral y la resistencia a estrés oxidativo. Este efecto se asoció con la activación de Akt y la fosforilación inhibitoria de GSK-3 $\alpha/\beta$ , lo que inhibe los niveles de Snail y favorece la transición epitelio-mesénquima (EMT), potenciando la supervivencia y la migración celular. Además, la disminución de la proteína S100A9 mediante shRNA en células SCLC disminuyó significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*, junto con una reducción de los marcadores de proliferación (Ki-67) y neovascularización (CD31), confirmando su papel como un mediador clave de la progresión tumoral (Charan et al., 2025).

Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el aumento de la proliferación observado a mayores niveles de expresión de S100A9 podría estar mediado por la activación de las vías Akt/GSK-3/Snail y RAGE-dependientes, favoreciendo la entrada al ciclo celular.

En contraste, las concentraciones bajas de S100A9 que condujeron a una proliferación reducida podrían reflejar una desregulación compensatoria mediada por inhibidores de CDKs, como p21 o p27. El estudio de Cheng et al. (2016) mostró que la regulación negativa de S100A9 está relacionada con el aumento de p21 y p27, inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas CDK2 y CDK4, lo que conlleva a la detención del ciclo celular y una menor proliferación (Cheng et al., 2016). Por otro lado, Zhang et al. (2024) reportó que la disminución de la expresión de S100A9 mediante siRNA reduce la expresión de señales pro-proliferativas (disminución de PI3-K, AKT, CDK1 y CDK2); sin embargo, el modelo empleado no correspondía a un contexto tumoral. Por ello, estos resultados no respaldan directamente la proliferación reducida observada en condiciones de baja expresión de S100A9, lo que se sugiere la necesidad de estudios adicionales para esclarecer este comportamiento.

A pesar de las diferencias en la expresión basal entre WT y RB -/-, no se observaron cambios significativos en la respuesta proliferativa relativa entre ambas líneas celulares, lo que sugiere que RB no es un modulador directo de la proliferación inducida por S100A9 bajo las condiciones estudiadas.

### S100A9 y viabilidad celular

El análisis de viabilidad mediante ensayos de clonogénesis indicó que la sobreexpresión de S100A9 incrementa la supervivencia celular en H1299 RB -/-, mientras que en H1299 WT se observó una tendencia a la disminución de la supervivencia respecto al control, aunque sin significancia estadística. Estos hallazgos sugieren que la ausencia de RB podría potenciar

la capacidad de S100A9 para promover la viabilidad celular, posiblemente debido a la pérdida del control transcripcional sobre genes reguladores del ciclo celular y apoptosis (Khammanivong et al., 2013). La relación entre S100A9 y los inhibidores de CDK (p21, p27) también podrían contribuir a modular la progresión del ciclo celular, especialmente en un contexto carente de RB.

De manera complementaria, Charan et. al (2025) demostraron que la sobreexpresión de S100A9 en células de SCLC no sólo favorece la proliferación sino también la supervivencia celular mediante la activación de Akt y la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\alpha/\beta$ , generando una resistencia al estrés oxidativo. En el mismo estudio, la reducción de S100A9 mediante shRNA disminuyó significativamente la proliferación, la viabilidad y la neovascularización in vivo, confirmando que S100A9 actúa como un modulador central de la supervivencia tumoral (Charan et al., 2025).

Estos hallazgos refuerzan nuestros resultados y sugieren que la ausencia de RB podría amplificar la capacidad de S100A9 para promover la viabilidad celular a través de vías Akt/GSK3/Snail además de mecanismos relacionados con resistencia al estrés y regulación del ciclo celular, destacando su papel como potenciador de fenómenos oncogénicos en contextos de pérdida de supresores tumorales como el caso del retinoblastoma.

### S100A9 y migración celular

Los ensayos de migración evidenciaron que la sobreexpresión de S100A9 no afectó significativamente la migración en H1299 WT, mientras que en H1299 RB -/- se observó un aumento en la velocidad de cierre de la herida con niveles elevados de S100A9. Estos resultados apoyan la hipótesis de que RB podría actuar como modulador de los efectos migratorios de S100A9. La activación de vías como FAK y MAPk por S100A9/S100A8 podría explicar la mayor migración observada en ausencia de RB, tal como se ha reportado en modelos de cáncer de mama triple negativo y carcinoma oral (Khammanivong et al., 2013; Rigracciolo et al., 2022).

Además, los hallazgos de Charan et al (2025) sugieren que la sobreexpresión de S100A9 en células de SCLC promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) mediante la activación de Akt y la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\alpha/\beta$ , lo que podría potenciar la migración y la invasión celular (Charan et al., 2025).

Esto respalda la idea de que S100A9 no sólo influye en la supervivencia sino también en la motilidad de células cancerígenas, y que la ausencia de RB puede amplificar este efecto al eliminar restricciones sobre genes que controlan la progresión del ciclo celular.

## Implicaciones moleculares y relevancia oncológica

La evidencia obtenida indica que S100A9 actúa como modulador de fenómenos celulares clave en la progresión tumoral, y que su efecto puede ser amplificado en contextos de pérdida de RB. En nuestros ensayos, la sobreexpresión de S100A9 en H1299 RB -/- potenció la migración y la viabilidad, mientras que en H1299 WT estos efectos fueron más moderados o no significativos, sugiriendo que la ausencia de RB puede favorecer la capacidad de S100A9 para promover fenotipos tumorales agresivos. En contraste, los resultados de la proliferación mostraron un comportamiento dependiente de la concentración de S100A9, con baja expresión inhibiendo ligeramente la proliferación y alta expresión incrementándola; esto no coincide completamente con los reportes previos de proliferación dependiente de Akt/GSK-3/Snail y vías MAPK/RAGE (Chang et al., 2016; Rigracciolo et al., 2022; Charan et al., 2025), lo que indica que los efectos de S100A9 sobre proliferación podrían estar modulados por otros factores celulares aún no identificados.

Además, la posible presencia de tetrámeros o complejos multiméricos de S100A9 en medios extracelulares, capaces de interactuar con receptores como RAGE, añade una capa adicional de regulación funcional que podría potenciar la supervivencia, migración y la resistencia al estrés oxidativo en células carentes de RB. Esto refuerza el papel de S100A9 como mediador clave de la progresión tumoral como potencial blanco terapéutico en contexto de desregulación simultánea de RB y S100A9, como se observa en ciertos tipos de cáncer agresivo, incluyendo retinoblastoma y neuroblastomas (Markowitz & Carson, 2013; Chen et al., 2021).

## Limitaciones y prospectivas

Si bien los resultados obtenidos ofrecen evidencia sólida sobre el papel de S100A9 en viabilidad y migración, y en menor medida en proliferación, el mecanismo preciso de interacción con RB permanece no esclarecido. Para estudios futuros se sugieren ensayos de coexpresión de S100A9 con RB, análisis de fosforilación de CDK's, y estudios de inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de la proteína. La caracterización de complejos proteicos y la identificación de vías de señalización activadas, como Akt/GSK3/Snail, MAPK/RAGE y posibles moduladoras del ciclo celular, permitirá profundizar en el entendimiento de cómo S100A9 contribuye a la progresión tumoral en ausencia o presencia de RB, estableciendo así su relevancia como blanco terapéutico.

Adicionalmente, se ha reportado que S100A9 es un gen transcripcionalmente regulado por p53 en condiciones de estrés genotóxico, y que su sobreexpresión puede inducir apoptosis dependiente de p53 (Li et al., 2009). En el retinoblastoma, la pérdida de RB es una característica central y se asocia frecuentemente con disfunción de p53, ya sea por mutaciones directas o por regulación alterada de MDM2 (Dimaras et al., 2015; Cruz-Gálvez

et al., 2022). Por lo tanto, en nuestro modelo H1299 RB -/- (que carece funcionalmente de RB y es p53-deficiente) la regulación negativa de S100A9 está ausente, permitiendo que S100A9 ejerza efectos pro-tumorales sobre proliferación, viabilidad y migración sin la contraparte apoptótica.

Estos hallazgos sugieren que la ausencia simultánea de RB y la inactivación de p53 en retinoblastoma podría potenciar los efectos oncogénicos de S100A9, amplificando la supervivencia celular y la capacidad migratoria. Por lo tanto, futuros estudios deberían estudiar cómo la restauración funcional de RB o la reactivación de p53 afectan la regulación de S100A9 y sus efectos sobre los fenotipos malignos observados.

## Bibliografía

- Aguayo S. et al. (2020) Quiescencia y senescencia: enfoque traslacional al paciente oncológico y críticamente enfermo. *Revista científica INSPIP V. (4), Número 1*, Guayaquil, Ecuador.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts K, & Walter, P. (2022). *Molecular biology of the cell (7th ed.)* W.W. Norton & Company.
- Aleem, E., & Arceci, R. J. (2015). Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. En *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 3, Número APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00016>
- Arai, K., Takano, S., Teratani, T., Ito, Y., Yamada, T., & Nozawa, R. (2008). S100A8 and S100A9 Overexpression Is Associated with Poor Pathological Parameters in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. En *Current Cancer Drug Targets* (Vol. 8).
- Asencio-López, L., Torres-Ojeda, A. A., Isaac-Otero, G., & Leal-Leal, C. A. (2015). Treating retinoblastoma in the first year of life in a national tertiary paediatric hospital in Mexico. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 104(9), e384–e387. <https://doi.org/10.1111/apa.13033>
- Biswas, A. K., Han, S., Tai, Y., Ma, W., Coker, C., Quinn, S. A., Shakri, A. R., Zhong, T. J., Scholze, H., Lagos, G. G., Mela, A., Manova-Todorova, K., de Stanchina, E., Ferrando, A. A., Mendelsohn, C., Canoll, P., Yu, H. A., Paik, P. K., Saqi, A., ... Acharyya, S. (2022). Targeting S100A9–ALDH1A1–Retinoic Acid Signaling to Suppress Brain Relapse in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discovery*, 12(4), 1002–1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0910>
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). *Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*.
- Chang, C. C., Khan, I., Tsai, K. L., Li, H., Yang, L. W., Chou, R. H., & Yu, C. (2016a). Blocking the interaction between S100A9 and RAGE V domain using CHAPS molecule: A novel route to drug development against cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(11), 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.008>
- Chang, C. C., Khan, I., Tsai, K. L., Li, H., Yang, L. W., Chou, R. H., & Yu, C. (2016b). Blocking the interaction between S100A9 and RAGE V domain using CHAPS molecule: A novel route to drug development against cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(11), 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.008>
- Charan, M., Mishra, S., Shilo, K., Zhang, X., Verma, A. K., Ghanta, P., Webb, A., & Ganju, R. K. (2025). S100A9 enhances tumor immune suppression and cancer cell survival in small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, 16(1), 774. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-08102-0>

- Chazin, W. J. (2011). Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins. *Accounts of Chemical Research*, 44(3), 171–179. <https://doi.org/10.1021/ar100110d>
- Chen, H., Xu, C., & Liu, Z. (2014a). Review Article S100 protein family in human cancer. En *Am J Cancer Res* (Vol. 4, Número 2). [www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)
- Chen, H., Xu, C., & Liu, Z. (2014b). Review Article S100 protein family in human cancer. En *Am J Cancer Res* (Vol. 4, Número 2). [www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)
- Chen, X., Xue, Y., Feng, J., Tian, Q., Zhang, Y., & Wang, Q. (2021a). Identification S100A9 as a potential biomarker in neuroblastoma. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 7743–7753. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06783-2>
- Chen, X., Xue, Y., Feng, J., Tian, Q., Zhang, Y., & Wang, Q. (2021b). Identification S100A9 as a potential biomarker in neuroblastoma. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 7743–7753. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06783-2>
- Cheng, S., Zhang, X., Huang, N., Qiu, Q., Jin, Y., & Jiang, D. (2016). Down-regulation of S100A9 inhibits osteosarcoma cell growth through inactivating MAPK and NF-KB signaling pathways. *BMC Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2294-1>
- Cruz-Gálvez, C. C., Ordaz-Favila, J. C., Villar-Calvo, V. M., Cancino-Marentes, M. E., & Bosch-Canto, V. (2022). Retinoblastoma: Review and new insights. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.963780>
- Davidoff, A. M. (2010). Pediatric oncology. *Seminars in Pediatric Surgery*, 19(3), 225–233. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2010.03.007>
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., & Gallie, B. L. (2015a). Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., & Gallie, B. L. (2015b). Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N. L., Piovesan, B., Marrano, P., Corson, T. W., Eagle, R. C., Squire, J. A., & Gallie, B. L. (2008). Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: Increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Human Molecular Genetics*, 17(10), 1363–1372. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn024>
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>

- Duronio, R. J., & Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008904>
- Dyson, N. J. (2016). *RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma*. <https://doi.org/10.1101/gad.282145>
- Elmore, S. (s/f). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. En *Cell Death and Differentiation* (Vol. 29, Número 5, pp. 946–960). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilsland, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. En *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 35, pp. S25–S54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016a). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016b). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. En *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Número 5, pp. 362–374). <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Friedmann-Morvinski, D., & Verma, I. M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. En *EMBO Reports* (Vol. 15, Número 3, pp. 244–253). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1002/embr.201338254>
- Gallie, B. L., Helen Dimaras, R., Kimani, K., O Dimba, E. A., Gronsdahl, P., White, A., & L Chan, H. S. (2012). Seminar. *Lancet*, 379, 1436–1482. <https://doi.org/10.1016/S0140>
- Garza-Garza, L. A., Ruiz-Lozano, R. E., Rebolledo-Méndez, G., Ibarra-Nava, I., Morales-Garza, H. J., & Ancona-Lezama, D. (2020). Challenge of Retinoblastoma in Mexico in 2020: Perspectives and Solutions. En *Journal of Ophthalmology* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/1953602>
- Geisse, S., & Fux, C. (2009). Chapter 15 Recombinant Protein Production by Transient Gene Transfer into Mammalian Cells. En *Methods in Enzymology* (Vol. 463, Número C, pp. 223–238). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63015-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63015-9)

- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. En *Experimental Hematology* (Vol. 30).
- Gong, X., Liang, Z., Yang, Y., Liu, H., Ji, J., & Fan, Y. (2020). A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. *Regenerative Biomaterials*, 7(3), 271–281. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa002>
- Grace Adams; A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochem (Lond)* 22 June 2020; 42 (3): 48–53. doi: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. En *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 137, Número 2, pp. e11–e16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Green, Michael R, and Joseph Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Print.
- Halperin, E. C. (2004). PALEO-ONCOLOGY: The role of ancient remains in the study of cancer. En *Perspectives in Biology and Medicine* (Vol. 47, Número 1, pp. 1–14). Johns Hopkins University Press. <https://doi.org/10.1353/pbm.2004.0010>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. En *Cell* (Vol. 144, Número 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (s/f). *Real Time Quantitative PCR*.
- Hipocrates. Sobre las enfermedades de las mujeres. *Tratados Hipocráticos Vol IV*. Madrid: Ed. Gredos; 1988. ISBN 84-249-1282-9.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-\* 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus). En *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Jian-Ping Kong, F. D. C.-N. Z. (2023). *Loss of myeloid-related proteins 8 and myeloid-related proteins 14 expression in human esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor differentiation*. Northleo Writing Inc.
- Juric, V., & Murphy, B. (2020). Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions. En *Cancer Drug Resistance* (Vol. 3, Número 1, pp. 48–62). OAE Publishing Inc. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.105>

- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments*, 88. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Karcioglu, Z. A. (2000). *FINE NEEDLE ASPIRATION BIOPSY (FNAB) FOR RETINOBLASTOMA*.
- Kaufman, R.J. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol Biotechnol* **16**, 151–160 (2000). <https://doi.org/10.1385/MB:16:2:151>
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Mojzych, M., & Kontek, R. (2022). Cyclin-dependent kinases in DNA damage response. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1877, Número 3). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188716>
- Khammanivong, A., Wang, C., Sorenson, B. S., Ross, K. F., & Herzberg, M. C. (2013). S100A8/A9 (Calprotectin) Negatively Regulates G2/M Cell Cycle Progression and Growth of Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069395>
- Kivelä, T. (2009). The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: Retinoblastoma, an issue of birth and death. En *British Journal of Ophthalmology* (Vol. 93, Número 9, pp. 1129–1131). <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.150292>
- Knudson, A. G. (1971). *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma* (Vol. 68, Número 4). <https://www.pnas.org>
- Kurata, A., Terado, Y., Schulz, A., Fujioka, Y., & Franke, F. E. (2005). Inflammatory cells in the formation of tumor-related sarcoid reactions. *Human Pathology*, 36(5), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.02.017>
- Kwon, C. H., Moon, H. J., Park, H. J., Choi, J. H., & Park, D. Y. (2013). S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation in gastric cancer cells. *Molecules and Cells*, 35(3), 226–234. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2269-x>
- Lavogina, D., Lust, H., Tahk, M. J., Laasfeld, T., Vellama, H., Nasirova, N., Vardja, M., Eskla, K. L., Salumets, A., Rinken, A., & Jaal, J. (2022). Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/bios12040196>
- Leal-Leal, C., Flores-Rojo, M., Medina-Sansón, A., Cerecedo-Díaz, F., Sánchez-Félix, S., González-Ramella, O., Pérez-Pérez, F., Gómez-Martínez, R., Quero-Hernández, A., Altamirano-Álvarez, E., Alejo-González, F., Figueroa-Carbajal, J., Ellis-Irigoyen, A., Tejocote-Romero, I., Cervantes-Paz, R., Pantoja-Guillén, F., Vega-Vega, L., & Carrete-Ramírez, F. (2004). A multicentre report from the Mexican Retinoblastoma Group. *British Journal of Ophthalmology*, 88(8), 1074–1077. <https://doi.org/10.1136/bjo.2003.035642>

- Lee, C., Chang, J. H., Lee, H. S., & Cho, Y. (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes and Development*, 16(24), 3199–3212. <https://doi.org/10.1101/gad.1046102>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lee, S. H., Lee, S. J., Yeon, S. J., Xu, Y., Ho, S. K., Ha, N. C., & Park, B. J. (2009). Blocking of p53-snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia*, 11(1), 22–31. <https://doi.org/10.1593/neo.81006>
- Li, C., Chen, H., Ding, F., Zhang, Y., Luo, A., Wang, M., & Liu, Z. (2009a). A novel p53 target gene, S100A9, induces p53-dependent cellular apoptosis and mediates the p53 apoptosis pathway. *Biochemical Journal*, 422(2), 363–372. <https://doi.org/10.1042/BJ20090465>
- Li, C., Chen, H., Ding, F., Zhang, Y., Luo, A., Wang, M., & Liu, Z. (2009b). A novel p53 target gene, S100A9, induces p53-dependent cellular apoptosis and mediates the p53 apoptosis pathway. *Biochemical Journal*, 422(2), 363–372. <https://doi.org/10.1042/BJ20090465>
- Li, Y., Kong, F., Jin, C., Hu, E., Shao, Q., Liu, J., He, D., & Xiao, X. (2019). The expression of S100A8/S100A9 is inducible and regulated by the Hippo/YAP pathway in squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5784-0>
- Łukasik, P., Załuski, M., & Gutowska, I. (2021). Cyclin-dependent kinases (Cdk) and their role in diseases development—review. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 6, pp. 1–33). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22062935>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maki, J. L., Marr, B. P., & Abramson, D. H. (2009). Diagnosis of Retinoblastoma: How good are referring physicians Diagnosis of Retinoblastoma: How good are referring physicians. *Ophthalmic Genetics*, 30(4), 199–205. <https://doi.org/10.3109/13816810903258837>
- Mallipatna, A. C., Sutherland, J. E., Gallie, B. L., Chan, H., & Héon, E. (2009). Management and outcome of unilateral retinoblastoma. *Journal of AAPOS*, 13(6), 546–550. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2009.09.004>
- Mansilla, S. F., de la Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., & Gottifredi, V. (2020). Cdk-independent and pcna-dependent functions of p21 in dna replication. En *Genes* (Vol. 11, Número 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11060593>

- Marenholz, I., Lovering, R. C., & Heizmann, C. W. (2006). An update of the S100 nomenclature. En *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1763, Número 11, pp. 1282–1283). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.013>
- Markert, E. K., Levine, A. J., & Vazquez, A. (2012). Proliferation and tissue remodeling in cancer: The hallmarks revisited. *Cell Death and Disease*, 3(10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.140>
- Markowitz, J., & Carson, W. E. (2013a). Review of S100A9 biology and its role in cancer. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1835, Número 1, pp. 100–109). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003>
- Markowitz, J., & Carson, W. E. (2013b). Review of S100A9 biology and its role in cancer. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1835, Número 1, pp. 100–109). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Número 1, pp. 74–88). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Mendoza, P. R., & Grossniklaus, H. E. (2015). The Biology of Retinoblastoma. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 503–516. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>
- Mondet, J., Chevalier, S., & Mossuz, P. (2021). Pathogenic roles of S100A8 and S100A9 proteins in acute myeloid and lymphoid leukemia: Clinical and therapeutic impacts. *Molecules*, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051323>
- Moore, B. W. (1965). *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS A SOLUBLE PROTEIN CHARACTERISTIC OF THE NERVOUS SYSTEM\** (Vol. 19, Número 6).
- Murphree, A. L. (2005). Intraocular retinoblastoma: The case for a new group classification. En *Ophthalmology Clinics of North America* (Vol. 18, Número 1, pp. 41–53). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ohc.2004.11.003>
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.02872>
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- Overview of vector design for mammalian gene expression.* (s/f).
- Page, B., Page, M., & Noël, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. En *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* (Vol. 3).

- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rigiracciolo, D. C., Nohata, N., Lappano, R., Cirillo, F., Talia, M., Adame-Garcia, S. R., Arang, N., Lubrano, S., De Francesco, E. M., Belfiore, A., Gutkind, J. S., & Maggiolini, M. (2022). Focal Adhesion Kinase (FAK)-Hippo/YAP transduction signaling mediates the stimulatory effects exerted by S100A8/A9-RAGE system in triple-negative breast cancer (TNBC). *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 41(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02396-0>
- Salaverry O. La etimología del cáncer y su curioso curso histórico [Cancer etymology and its historical curious course]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013 Mar;30(1):137-41. Spanish. doi: 10.1590/s1726-46342013000100026. PMID: 23612828.
- Sánchez Alvarado, A., & Yamanaka, S. (2014). Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. En *Cell* (Vol. 157, Número 1, pp. 110–119). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.041>
- Sarhadi, V. K., & Armengol, G. (2022). Molecular Biomarkers in Cancer. En *Biomolecules* (Vol. 12, Número 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12081021>
- Shabani, F., Mahdavi, M., Imani, M., Hosseinpour-Feizi, M. A., & Gheibi, N. (2020). Calprotectin (S100A8/S100A9)-induced cytotoxicity and apoptosis in human gastric cancer AGS cells: Alteration in expression levels of Bax, Bcl-2, and ERK2. *Human and Experimental Toxicology*, 39(8), 1031–1045. <https://doi.org/10.1177/0960327120909530>
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). *REVIEW The RB and p53 pathways in cancer The life history of cancer cells encompasses a series of genetic missteps in which normal cells are progressively transformed into tumor cells that invade surrounding tissues and become malignant.*
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. En *Acta Histochemica* (Vol. 120, Número 3, pp. 159–167). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- Strathapoulos, G. 1975. Kanam mandible's tumour. *Lancet* 1:165.
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? En *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 5, Número 6, pp. 463–466). <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

- Tang, Y., Zhang, Z., Chen, Y., Qin, S., Zhou, L., Gao, W., & Shen, Z. (2022). Metabolic Adaptation-Mediated Cancer Survival and Progression in Oxidative Stress. En *Antioxidants* (Vol. 11, Número 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11071324>
- Van Diest, P. J., Van Der Wall, E., & Baak, J. P. A. (2004). Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: A review. En *Journal of Clinical Pathology* (Vol. 57, Número 7, pp. 675–681). <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.010777>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. En *Cell Prolif* (Vol. 36).
- Wang, Z. (2021). Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. En *Cells* (Vol. 10, Número 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>
- Wolf, J., Hajdu, R. I., Boneva, S., Godbole, I., Stürzbecher, L., Auw-Haedrich, C., Lagrèze, W. A., Agostini, H., Reinhard, T., Tholen, S., Schilling, O., Schlunck, G., Bengsch, B., & Lange, C. (2025). A proteotranscriptomic approach to dissect the molecular landscape of human retinoblastoma. *Frontiers in Oncology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1571702>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. En *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 30, Número 1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Wood, C. E., Hukkanen, R. R., Sura, R., Jacobson-Kram, D., Nolte, T., Odin, M., & Cohen, S. M. (2015). Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Review\*: Interpretation and Use of Cell Proliferation Data in Cancer Risk Assessment. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 760–775. <https://doi.org/10.1177/0192623315576005>
- Xu, X. L., Singh, H. P., Wang, L., Qi, D. L., Poulos, B. K., Abramson, D. H., Jhanwar, S. C., & Cobrinik, D. (2014). Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature*, 514(7522), 385–388. <https://doi.org/10.1038/nature13813>
- Yin, J., Zhang, F., Cao, J. et al. Gentiopicroside inhibits retinoblastoma cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in nude mice by suppressing the PI3K/AKT pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 397, 1003–1013 (2024).
- Zabradý, M., Zabradý, K., Li, A. W. H., & Doherty, A. J. (2023). Reverse transcriptases prime DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, 51(14), 7125–7142. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad478>
- Zha, H., Li, X., Sun, H., Duan, L., Yuan, S., Li, H., Li, A., Gu, Y., Zhao, J., Xie, J., & Zhou, L. (2019). S100A9 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition and activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *International Journal of Oncology*, 55(1), 35–44. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4793>