

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

***“Perfiles de expresión de microRNAs en cáncer de mama  
y análisis de la participación del miR-944 y miR-18b  
en la adhesión focal y migración celular”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

**Miguel Ángel Fonseca Sánchez**

Director de tesis

**Dr. Mario César López Camarillo**

México, D.F. FEBRERO 2014

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM3 TDV254

## COMITÉ TUTORIAL

### DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo  
Profesor Investigador  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### ASESORES

Dr. José Efraín Garrido Guerrero  
Investigador Cinvestav 3C  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Dra. Laurence A. Marchat Marchau  
Profesora Titular A  
Posgrado Institucional en Biomedicina Molecular  
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía de IPN

Dra. Elena Arechaga Ocampo  
Investigadora.  
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Mavil López Casamichana  
Profesora Investigadora  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Martha Yocupicio Monroy  
Profesora Investigadora  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez  
Profesora Investigadora  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. José de Jesús Olivares Trejo  
Profesor Investigador  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer, en el Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, bajo la tutoría del Dr. César López Camarillo al cual agradezco permitirme colaborar en sus proyectos de investigación y la estancia en su laboratorio.

Agradezco el apoyo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como al Colegio del Posgrado de Ciencias Genómicas por su apoyo al desarrollo de este trabajo.

Los perfiles de expresión de miRNAs fueron realizados en colaboración con el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, perteneciente al Instituto Nacional de Medicina Genómica, con amplio apoyo de la Biol. Sandra Lorena Romero Córdoba a quienes agradezco y respeto profundamente.

Esta tesis forma parte de los proyecto CONACYT SALUD 115306 “Perfiles de expresión genómica de microRNAs en biopsias de tumores de cáncer de mama en población mexicana”, así como del convenio ICyT/328/2011.

Así mismo, reconozco al ICyT-DF por la beca BI-080530152657, otorgada para realizar este proyecto de doctorado durante el periodo de agosto 2009 a julio del 2012 y por el apoyo de extensión de beca que fue proporcionado mediante el convenio ICyT/179/2011 durante el periodo Agosto 2012 a Julio 2013.

Agradezco ampliamente la colaboración del Instituto de Enfermedades de la mama-FUCAM por la donación de las biopsias de tejido normal y tumoral de las pacientes utilizadas en este estudio.

## Dedicatorias

*A mis padres Alfonso Fonseca y Rosario Sánchez*

*Por todo el amor y apoyo que me han brindado.  
Por ustedes soy lo que he podido llegar a ser.  
Jamás me alcanzarán las palabras para agradecerle a Dios su presencia.*

*A mis hermanos Luis y Efrén*

*Porque son los mejores compañeros que la vida me pudo brindar.  
En el juego de la vida, siempre estaremos lado a lado.*

*A mi hija Mayda Aurora*

*Te llamas Aurora porque eres la luz de mi vida.  
Eres mi mayor alegría y la persona más frágil que me hace ser fuerte.  
Eres la mayor bendición de todas las que tengo.*

*En especial a mis amigos*

*Miguel Ángel del Moral, José Alí Flores y Alma Villalobos.  
Jorge Angel Cruz y David Cruz.  
Rene Escalona y Genaro Vázquez.  
Zaira Arellano, Ana González, Angeles Reyes y Yadira Palacios.  
Olga Hernández, Karen Ríos e Itzel López. Paloma Cedillo H.  
Por la gran amistad que me han mostrado, por levantarme una y mil veces.  
Sin ustedes nunca lo hubiera logrado.*

*RABV*

*Por que no importa el destino sino el camino recorrido.  
Por cada momento que compartiste conmigo.  
"y es que vienes siempre, o casi siempre vienes con el sol"*

## INDICE

Abreviaturas	XI
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Resumen	XVI

### I. INTRODUCCIÓN.

<b>1. Antecedentes generales del tema.</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del cáncer.	1
1.2. Oncogénesis.	3
1.2.1. Inicio.	3
1.2.2. Promoción.	4
1.2.3. Progresión.	5
1.2.4. Metástasis.	6
1.3. Datos estadísticos sobre los distintos tipos de cáncer.	
1.4. Cáncer de mama: estadísticas mundiales de incidencia, prevalencia y mortalidad.	8
1.5. Estadísticas del cáncer de mama en México.	12
1.6. Factores de riesgo en cáncer de mama.	16
1.7. Tratamientos contra el cáncer de mama.	19
1.8. Estructura de la glándula mamaria.	22
1.9. Clasificación del cáncer de mama.	27
1.9.1. Clasificación del cáncer de mama por etapas clínicas.	27
1.9.2. Clasificación del cáncer de mama en base a histopatología.	27
1.9.3. Clasificación del cáncer de mama en base a marcadores hormonales.	28
1.9.4. Clasificación molecular del cáncer de mama.	32
1.10. Los miRNAs son reguladores de la expresión genética.	34
1.11. Nomenclatura de los miRNAs.	36
1.12. Biogénesis de los miRNAs.	37
1.13. Funciones de los miRNAs.	41



1.14. miRNAs y cáncer.	42
1.15. Oncomirs; miRNAs como oncogenes y supresores de tumor.	43
<b>2. Estado del Arte.</b>	46
2.1. El cáncer de mama en México.	46
2.2. La importancia de la detección temprana del cáncer de mama.	49
2.3. Diagnóstico molecular del cáncer de mama.	53
2.4. Perfiles de expresión genómica y proteómica en cáncer de mama.	57
2.5. Uso de los miRNAs para la clasificación y pronóstico del cáncer.	58
<b>3. Antecedentes particulares del proyecto.</b>	60
3.1. miRNAs en carcinomas de mama.	60
3.2. Metastamirs: miRNAs asociados a migración, invasión y metástasis.	61
3.2.1. El miR-155 es sobreexpresado en cáncer de mama.	62
3.2.2. El miR-21 es sobreexpresado en cáncer.	63
3.2.3. El miR-205 es comúnmente reprimido en cáncer.	64
3.2.4. La familia de miR-200 se asocia a la transición epitelial mesenquimal.	64
3.2.5. La familia de let-7 actúa como supresor tumoral.	65
3.2.6. El miR-10b es un marcador de metástasis.	65
3.2.7. Los miR-126, miR-206 y miR-335 son supresores de tumor.	66
3.2.8. El miR-373 es sobreexpresado en cáncer.	67
3.2.9. El miR-31 es un miRNA anti-metastático.	67
3.2.10. El miR-146a/b como miRNA antimetastático.	68
3.3. Los complejos de adhesión focal y su relación con la migración e invasión.	69
3.3.1. Dinámica de la adhesión focal en células migrantes.	73
<b>4. Importancia de continuar el estudio del tema.</b>	76

## **II. OBJETIVOS.**

Objetivo general.	78
Objetivos particulares.	78

## **III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.**

Estrategia experimental general.	79
----------------------------------	----

## **IV. METODOLOGÍA**

1. Obtención de biopsias de tejido mamario tumoral y tejido mamario normal.	81
2. Estratificación y selección de muestras.	82
3. Lisis y extracción de RNA total de biopsias mamarias.	83
4. Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA total purificado.	84
5. Transcripción reversa (RT) de miRNAs.	84
6. Preamplificación del producto de RT.	85
7. Perfiles de expresión de miRNAs.	86
8. Análisis del perfil de expresión de miRNAs.	87
9. Análisis bioinformáticos.	88
10. Análisis de la expresión de miRNAs con sondas individuales.	90
11. Cultivo de líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75 y T47-D.	92
12. Lisis y extracción de RNA total de líneas celulares.	93
13. Transfección de las moléculas precursoras e inhibidoras de miRNAs.	94
14. Hibridación de microarreglos de expresión génica.	94
15. Validación de los microarreglos de expresión.	95
16. Evaluación de la viabilidad celular por ensayos MTT.	97
17. Ensayo Wound-healing de migración.	97
18. Ensayo de migración celular en cámaras transwell.	98
19. Ensayo de invasión celular en cámaras transwell.	99

20. Extracción de proteínas de células transfectadas con el pre-miR-944.	100
21. Ensayos Western Blot.	100
22. Ensayo de Inmunofluorescencia.	101

## V. RESULTADOS.

1. Datos clínicos de las pacientes.	103
2. Análisis de la expresión de miRNAs en tumores mamarios.	108
3. Los miRNAs del clúster 14q32 se reprimen en los tejidos tumorales.	114
4. Validación de la expresión de miRNAs obtenido por TLDA.	117
5. Blancos predichos y validados de los miRNAs del perfil de expresión.	118
6. Vías de señalización afectadas por los miRNAs modulados en cáncer de mama.	121
7. Análisis de enriquecimiento y ontogenia de los blancos predichos de los miRNAs modulados en los tumores mamarios.	126
8. miRNAs con funciones no conocidas en cáncer de mama.	131
9. Selección de miRNAs como para su estudio funcional.	135
10. La expresión del miR-944 es suprimida en tumores y líneas celulares de cáncer de mama.	139
11. La expresión del miR-944 no afecta la viabilidad celular	140
12. Búsqueda de transcritos regulados por el miR-944 mediante microarreglos de expresión.	142
13. El miR-944 modula la migración en líneas celulares mamarias.	174
14. La expresión del miR-944 en células MDA-MB-231 inhibe la invasión celular.	175
15. La expresión del miR-944 induce cambios en la expresión de las proteínas de adhesión focal.	179
16. El miR-18b se sobreexpresa en tumores mamarios y líneas celulares de cáncer de mama.	184
17. La represión del miR-18b no afecta la viabilidad celular	189

18. Búsqueda de genes modulados por el miR-18b mediante microarreglos de expresión.	189
19. El miR-18b inhibe la migración celular <i>in vitro</i>	202
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	205
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	226
<b>VIII. ANEXOS</b>	228
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	233

## ABREVIATURAS

ASR	Tasa estandarizada por edad
BRCA1	Cancer de mama 1
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
CK	Citoqueratina
cm	Centímetros
ddH <sub>2</sub> O	Agua desionizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia enzimática
EDTA	Ácido etilén diamino tetracético
g	Gramo
h	hora
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal humano
Her2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP	Inmunoprecipitación
kDa	Kilodalton
ml	Mililitro
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
miRNA	MicroRNA
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pH	Potencial de hidrógeno
PI	Punto isoeléctrico
pm	picomolar
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
Seg	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIPAM	Salud integral para la mujer A.C
SNPs	Polomorfismo de un solo nucleótido
SSDF	Secretaria de salud del distrito federal
TCA	Acido tricloroacético
TDLU	Unidad terminal ductal lobular
TLDA	Arreglo Taqman de baja densidad
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
UACM	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
V	Volts
Vh	Voltaje hora
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial en cada género.	10
Figura 2. Incidencia y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en ambos sexos a nivel mundial.	11
Figura 3. Tasa de mortalidad en mujeres mexicanas por cáncer cervicouterino y cáncer de mama.	13
Figura 4. Tasa estandarizada de mortalidad por cáncer de mama en las regiones geográficas de México.	15
Figura 5. Estructura de la TDLU.	23
Figura 6. Anatomía de la glándula mamaria.	25
Figura 7. Biogénesis de miRNAs	40
Figura 8. Participación de los miRNAs en el proceso de la metástasis.	70
Figura 9. Estructura básica de los complejos de adhesión celular.	72
Figura 10. Dinámica de las moléculas de adhesión focal durante la migración.	75
Figura 11. Estrategia expremienta.	80
Figura 12. Características clínicas de las biopsias que conforman el banco de tumores y tejidos mamarios normales.	106
Figura 13. Expresión de miRNAs diferenciales en tumores mamarios.	109
Figura 14. Expresión de miRNAs en diversos clústers y su relación con la amplificación y delección del material genético.	115
Figura 15. Expresión de los miRNAs localizados en el clúster 14q32.	116
Figura 16. Validación de la expresión de los miRNAs obtenida mediante TLDA.	119
Figura 17. Regulación coordinada de miRNAs sobre la vía de MAPK.	125
Figura 18. Análisis de enriquecimiento y ontología de los blancos predichos para los miRNAs modulados.	128
Figura 19. Expresión del miR-944 en líneas celulares de cáncer de mama y biopsias tumorales.	141
Figura 20. El miR-944 modula la migración celular <i>in vitro</i> .	177

Figura 21. El miR-944 reprime la invasión celular <i>in vitro</i> .	178
Figura 22. El miR-944 modula la expresión de proteínas de adhesión focal.	181
Figura 23. El miR-944 reduce la migración e invasión a través de la estabilización de las adhesiones focales.	182
Figura 24. Expresión del miR-18b en líneas celulares de cáncer de mama y biopsias tumorales.	188
Figura 25. El miR-18b modula la migración celular.	204



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del cáncer de mama en México y el mundo.	17
Tabla 2. Características de los tumores mamarios según el estadio tumoral.	29
Tabla 3. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.	30
Tabla 4. Clasificación del cáncer de mama por marcadores hormonales.	31
Tabla 5. Clasificación molecular del cáncer de mama.	33
Tabla 6. Características clinicopatológicas de los tumores mamarios analizados por TLDA.	107
Tabla 7. MicroRNAs modulados en los nueve tumores ductales invasores analizados por TLDA.	110
Tabla 8. Localización cromosómica de los miRNAs desregulados en tumores mamarios.	113
Tabla 9. Blancos predichos y validados de los miRNAs modulados en los tumores de pacientes mexicanas.	122
Tabla 10. Vías de señalización potencialmente afectadas por los miRNAs desregulados en las biopsias analizadas.	124
Tabla 11. Análisis de enriquecimiento y ontología de los blancos potenciales de los miRNAs modulados en el perfil.	129
Tabla 12. miRNAs modulados en tumores mamarios con funciones no descritas previamente en cáncer de mama	132
Tabla 13. Genes modulados ( $FC \pm 1.5$ ) en células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944.	145
Tabla 14. Genes modulados por miR944 en células MDA-MB-231 que participan en migración e invasión.	170
Tabla 15. Genes modulados ( $FC \pm 1.5$ ) en células MDA-MB-231 transfectadas con el Inh-miR-18b.	193
Tabla 16. Genes con función implicada en cáncer modulados por efecto de la inhibición del miR-18b.	200

## RESUMEN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia con mayor índice de morbilidad y mortalidad entre las mujeres en el mundo. Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños de 22 nt no codificantes, que participan como reguladores negativos de la expresión génica. Se ha reportado que diversos miRNAs se expresan de forma aberrante en CM y que su expresión se puede correlacionar con los datos clínicos del paciente, por lo que pueden representar nuevos biomarcadores y blancos moleculares para el tratamiento.

En el presente estudio identificamos miRNAs expresados diferencialmente entre tumores mamarios y el tejido mamario normal de pacientes mexicanas. Realizamos el análisis de la expresión global de 641 miRNAs en nueve tumores y en tejidos mamarios sanos utilizando el arreglo TaqMan de baja densidad (TLDA, Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el software SDS 2.0 y DataAssist 3.0. Este análisis evidenció la modulación de 54 miRNAs (20 sobreexpresados, 34 reprimidos) con una tasa de valor de cambio  $\geq 2.0$  ( $P \leq 0,05$ ). La predicción de los RNAm blanco y las vías celulares potencialmente afectadas por estos miRNAs se realizó con los programas TargetScan, miRBase y DIANA-mirPath, encontrado genes que participan en las vías de señalización MAPK, WNT, TGF- $\beta$ , receptor de estrógenos  $\alpha$  y diversos procesos oncológicos. Con base a las predicciones los miRNAs elegidos para su estudio funcional fueron; el miR-944 (expresión

reprimida y no caracterizado previamente en cáncer de mama) y el miR-18b (sobrexpresado y asociado a la regulación de los receptores de estrógenos  $\alpha$ ).

El análisis de la expresión del miR-944 se realizó mediante ensayos RT-PCR TaqMan microRNA (Applied Biosystems) en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75 y T47D, así como en un set amplio de pacientes. Los resultados mostraron que la expresión del miR-944 se encontró reprimida en las cinco líneas celulares, así como en el 75% de los tumores analizados. Con el fin de elucidar la función de este miRNA en el proceso oncológico se realizaron diversos estudios. En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular (ensayo MTT) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944 (5-200 nM), la cual no fue afectada en ningún caso. Posteriormente, el transcriptoma de las células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944 (50 nM) fue evaluado mediante microarreglos de expresión génica, evidenciando la modulación de genes implicados en la migración e invasión como PRKCA, MTDH y PAK1 entre otros.

Al evaluar el efecto de la expresión del miR-944 en la migración celular de los cultivos MDA-MB-231 y MCF-7 (ensayos wound-healing y transwell), encontramos una reducción aproximada del 60% en las células transfectadas con el pre-miR-944 en comparación con el control. Por otra parte, el proceso de invasión fue evaluado mediante ensayos transwell-matrigel en células MDA-MB-

231, encontrando que la invasión fue reducida significativamente en un 40% en las células transfectadas con el pre-miR-944 respecto a las células control.

El mecanismo mediante el cual se reduce la migración e invasión por efecto de la expresión del miR-944, fue estudiado mediante ensayos Western blot y de inmunofluorescencia. Se analizó la expresión de proteínas que participan en la adhesión focal como integrina, talina, vinculina, paxilina y actinina en células transfectadas con el miR-944. Este complejo multiproteico posee un alto dinamismo de ensamble/desensamble, lo cual es fundamental para la formación de invadopodios que son requeridos durante el proceso de la migración e invasión celular. Los resultados mostraron que la expresión del miR-944 estabiliza los complejos de adhesión focal, lo que sugiere que al evitar el recambio de sus componentes la migración e invasión celular es reprimida. Además observamos cambios en la organización del citoesqueleto de actina y en la localización de  $\alpha$ -actinina1, congruentes con un fenotipo de supresión de la migración.

Por otra parte, la evaluación funcional del miR-18b fue realizada de manera similar al miR-944. Primero, la expresión del miR-18b fue evaluada mediante RT-PCR TaqMan en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75, T47D, así como en tejidos mamarios encontrando que el miR-18b se sobreexpresa en cuatro de las cinco líneas celulares analizadas (a excepción de la línea celular MCF-7), así como en el 60% de los tumores

evaluados. En el caso de la viabilidad celular, esta fue evaluada mediante el ensayo MTT en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el Inh-miR-18b (5-200 nM). No se apreciaron alteraciones en ningún caso. Posteriormente, el transcriptoma de las células MDA-MB-231 transfectadas con el Inh-miR-18b (50 nM) fue evaluado mediante microarreglos de expresión génica, evidenciando la modulación de genes implicados en la migración como NLRP7, KLK3, OLFM3, POSTN, MAGED4B, KIR3DL3, CRX, SEMG1 y CEACAM5, lo cual sugiere la participación de este miRNA en la motilidad celular. El efecto de la inhibición del miR-18b en la migración celular fue evaluado mediante ensayos wound-healing y transwell en células MDA-MB-231 y MCF-7 transfectadas con el Inh-miR-18b (50 nM). Los resultados mostraron una reducción significativa de la migración del 75% en las células MDA-MB-231 y del 30% en las células MCF-7 transfectadas con el Inh-miR-18b en comparación con el control. Estos datos son consistentes con lo encontrado en el microarreglo de expresión correspondiente por lo cual el miR-18b puede estar regulando de manera directa o indirecta la migración.

En conclusión, en el presente estudio identificamos un grupo de miRNAs desregulados en los tumores mamarios de pacientes mexicanas, algunos de los cuales no han sido reportados previamente en este padecimiento. Así mismo, se establece por primera vez que el miR-944 es reprimido en tumores mamarios y que participa en la regulación de la migración e invasión de células de cáncer de mama a través de la regulación de las adhesiones focales.

Finalmente, mostramos que el miR-18b se encuentra sobreexpresado en tumores mamarios y modula el proceso de migración en células de cáncer de mama.

## **I. INTRODUCCION.**

### **1. Antecedentes generales del tema.**

#### **1.1 Generalidades del cáncer.**

El cáncer es un conjunto de patologías etiológicamente distintas entre sí, que se caracteriza por la pérdida del balance entre la muerte celular programada y la proliferación celular, debido a un daño o alteración genética. La propagación de estas células anormales o malignas, se realiza de forma rápida e incontrolada lo que genera una masa conocida como tumor o neoplasia. Las células que conforman a este crecimiento pueden llegar a adquirir la capacidad de invadir tejidos vecinos (tumores invasivos) y posteriormente llegar a diseminarse hasta otros órganos y tejidos sanos del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático en un proceso conocido como metástasis. Los nuevos tumores generados por este proceso son denominados tumores secundarios o metastásicos. Finalmente, la generación de estos tumores en distintos órganos vitales provoca el mal funcionamiento de ellos, llevando al paciente a una larga agonía hasta que finalmente sucumbe a la muerte <sup>1,2</sup>.

La palabra cáncer proviene del griego karkinos (καρκίνος), que significa 'cangrejo', nombre dado en la antigüedad a esta enfermedad por la forma que adopta el crecimiento tumoral <sup>3</sup>. Por otra parte, el término neoplasia, acorde a sus raíces etimológicas es "tejido en nueva formación" y clínicamente se denomina neoplasia a un tumor o crecimiento irregular sea benigno o no; aunque generalmente se aplica a los tumores malignos substituyendo la palabra

cáncer <sup>4</sup>. Actualmente, se conocen cerca de 100 tipos distintos de cáncer, que toman su nombre acorde al órgano donde se origina, pudiendo ser agrupados en categorías más amplias acorde a su origen celular <sup>5</sup>.

**Carcinoma:** cáncer que se origina en las células epiteliales que revisten o cubren los órganos internos. Ej; a carcinoma de piel, boca, pulmón, mama, estómago, útero y colon.

**Adenocarcinoma:** Carcinoma proveniente de células que constituyen el lumen o revestimiento interno de las glándulas de secreción externa y poseen propiedades de secreción. Ej; adenocarcinoma de riñón, páncreas, próstata, estómago, tiroides y mama.

**Sarcoma:** cáncer originario de células de sostén o del tejido conjuntivo o tejidos mesodérmicos como el hueso, cartílago, grasa, músculo, y vasos sanguíneos. Ej; liposarcoma, fibrosarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma.

**Leucemia:** cáncer originario de células de la médula ósea que produce grandes cantidades de células sanguíneas anormales presentes en el torrente sanguíneo. Ej; linfoma y mieloma.

**Cáncer del sistema nervioso central:** cáncer que se origina en el tejido cerebral y de la médula espinal. Ej; Glioma.

**Mesoteliomas:** Cáncer que se originan en las membranas serosas y que pueden tener componente epitelial o mesenquimatoso. Ej; pleura, pericardio, peritoneo <sup>5-7</sup>.



## 1.2. Oncogénesis.

El cáncer es una enfermedad con un desarrollo que puede durar varios años, desde que una célula normal adquiere mutaciones que le brindan la capacidad de proliferar de manera exacerbada hasta el estado metastásico. El proceso mediante el cual una célula normal llega a transformarse en una célula maligna se conoce como oncogénesis. Esta consta de tres etapas: inicio, promoción y progresión<sup>6-9</sup>.

### 1.2.1. Inicio

En el inicio, la célula debe adquirir a lo largo de la vida del paciente, una serie de mutaciones o alteraciones genéticas que le conferirán su carácter de "maligna". Existe una amplia gama de ellas que van desde mutaciones germinales y que predisponen una mayor susceptibilidad a la enfermedad (como el caso del gen de retinoblastoma RB) y mutaciones somáticas (como las sustituciones, inserciones, deleciones, rearrreglos, incremento o reducción del número de copias), así como eventos epigenéticos reguladores de la transcripción (la sobreexpresión de la metiltransferasa inhibe la metilación favoreciendo la transcripción)<sup>6-9</sup>. Estos fenómenos varían en cada tipo de tumor y en cada paciente, pero sin importar cual sea el tipo de mutación, aquellas que no contribuyen al desarrollo tumoral se conocen como mutaciones pasajeras, mientras que aquellas que están claramente implicadas en la oncogénesis se conocen como conductoras (driver). Estas últimas son aquellas que motivan la expansión clonal y se encuentran sometidas a una presión de selección natural

ejercida por el microambiente del tejido, por lo cual pueden estar presentes o no en los estadios tardíos del tumor <sup>10</sup>. Las mutaciones espontáneas que se dan en la etapa de inicio, son causadas por agentes intrínsecos (producidos internamente como los radicales libres y diversos productos del metabolismo celular) o extrínsecos (externos) y se denomina como “agente iniciador” a la molécula que inicia esta cascada de mutaciones. Los agentes iniciadores pueden ser agentes físicos (radiación ionizante), químicos (aminas aromáticas, benceno y aflatoxinas) o virales (Virus del papiloma humano, Epstein bar, y hepatitis B/C) <sup>6-15</sup>.

### 1.2.2. Promoción.

Durante la segunda etapa de la oncogénesis, la promoción, se lleva a cabo el crecimiento tisular, proceso que deriva a la eventual formación del tumor. Este crecimiento se ve favorecido por compuestos químicos propios del cuerpo que inducen la expansión clonal de las células afectadas. Entre estos se encuentran: el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y los factores de crecimiento transformante (TGF- $\beta$  y TGF- $\alpha$ ), entre otros. En diversos tipos tumorales ha sido evidenciada la sobreexpresión de receptores a los diversos factores de crecimiento mencionados anteriormente. Como consecuencia de esto, la autoinducción o activación constitutiva, permite que estos receptores emitan la cascada de señalización correspondiente aún en ausencia de sus ligandos.

Entre los casos más destacados tenemos el del receptor Her2 en cáncer de mama y el EGFR en cáncer de pulmón<sup>6-8, 16</sup>.

También algunas hormonas tales como la insulina, la prolactina y los estrógenos favorecen el crecimiento de tumores hormona-dependientes. Uno de los más claros ejemplos es el cáncer de mama y de tractos genitales. Finalmente, en esta etapa de crecimiento el tumor incipiente requiere una mayor cantidad de nutrientes y de oxígeno, por lo que requiere vascularizarse (angiogénesis), acción que es promovida por los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>6-11, 16</sup>.

### **1.2.3. Progresión.**

La tercera etapa de la oncogénesis es la progresión, la cual implica que las células tumorales adquieran la capacidad de invadir tejidos vecinos (tumor invasor) o a distancia (tumor metastásico)<sup>17</sup>. La pérdida de las moléculas de adhesión celular (integrinas, cadherinas, cateninas y anillos de actina) que están relacionadas con el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular, son degradadas por metaloproteasas de matriz (MMPS). Esto es el comienzo del proceso conocido como transición epitelial-mesénquimal, en el cual las células epiteliales tumorales se convierten en células migratorias<sup>18</sup>. Durante la transición epitelial mesénquimal, se hace evidente la transcripción del gene Twist1, que actúa favoreciendo la sobreexpresión de MMPS y reprimiendo elementos como TIMP (proteína inhibidora de las metaloproteinasas).

Finalmente, las células tumorales pierden la polaridad ápico-basal lo que lleva a la desorganización de la membrana basal. A nivel microscópico las células pierden su forma característica, fenómeno conocido como anaplasia <sup>19, 20</sup>.

Una característica frecuente durante la progresión tumoral es la generación de estructuras con alta actividad del citoesqueleto de actina llamadas invadopodios que contienen altos niveles de MMPS, las cuales a su vez, al degradar la matriz facilitan el paso de las células migrantes por el estroma y permiten un mayor acceso a los factores de crecimiento embebidos en ella <sup>6-10,17</sup>. El primer obstáculo que enfrentan las células invasoras es atravesar la membrana basal y posteriormente superar otras barreras químicas del medio ambiente ajeno como el pH, la carencia de oxígeno (hipoxia) y cambio del pH, además de ser capaces de evadir el sistema inmune y confrontar citocinas inhibitorias (TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ). Es entonces cuando comienza la metástasis, la cual se ve influida por el patrón de flujo sanguíneo y la presencia de factores quimioatrayentes en él, afines al conjunto de receptores expresados en la superficie de la célula tumoral <sup>6-10, 16-21</sup>.

#### **1.2.4. Metástasis.**

Como se ha mencionado anteriormente, la principal causa de muerte por cáncer es la metástasis. Esta se lleva a cabo a través de un largo proceso denominado "cascada metastásica" de la cual se identifican diversos pasos <sup>6, 8, 17</sup>.

- Crecimiento del tumor primario y división celular irregular
- Invasión al tejido aledaño al tumor y ruptura de la lamina basal
- Intravasación al sistema circulatorio o linfático.
- Circulación y supervivencia de la célula tumoral en el sistema circulatorio
- Extravasación a un sitio distante infiltrando la lamina basal de otro tejido
- Proliferación del cáncer en el sitio metastásico
- Formación de micrometástasis en el sitio afectado
- Colonización progresiva

Actualmente no se ha determinado el por qué dependiendo del tipo de tumor, las células metastásicas invaden órganos de manera preferencial (el cáncer de próstata invade principalmente hueso, cáncer de colon a hígado y estómago a ovarios en mujeres). A este respecto la teoría de la semilla y el suelo (seed and soil) generada desde 1889 <sup>22</sup> explica que las células tumorales necesitan un lugar químicamente semejante a su tejido de origen. Por ejemplo, las células tumorales mamarias suelen necesitar iones de calcio para sobrevivir, por lo que los huesos representan un ambiente propicio para asentarse. En contra parte, James Ewing propone 30 años después, que la metástasis está influenciada por rutas anatómicas y mecánicas del cuerpo. En el cáncer de mama por ejemplo, se suele invadir ganglios linfáticos regionales y axilares, lo que se conoce clínicamente como nudo positivo o enfermedad regional <sup>22</sup>. Independientemente de cuál sea la explicación más adecuada al fenómeno de la metástasis, es este último proceso el que lleva a la muerte al paciente al diseminar la enfermedad en el resto del cuerpo.

### 1.3. Datos estadísticos sobre los distintos tipos de cáncer.

Acorde a los datos más actuales (2008), registrados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (13% del total) ocurridas en todo el mundo. Más del 70% de las muertes por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Desafortunadamente, el número de fallecimientos por este padecimiento sigue aumentando en todo el mundo y se estima que en el año 2030 supere los 13,1 millones. Las cinco formas más comunes de cáncer reportadas son:

Pulmonar	1,37 millones de defunciones
Gástrico	736,000 defunciones
Hepático	695,000 defunciones
Colorectal	608,000 defunciones
Mamario	458,000 defunciones

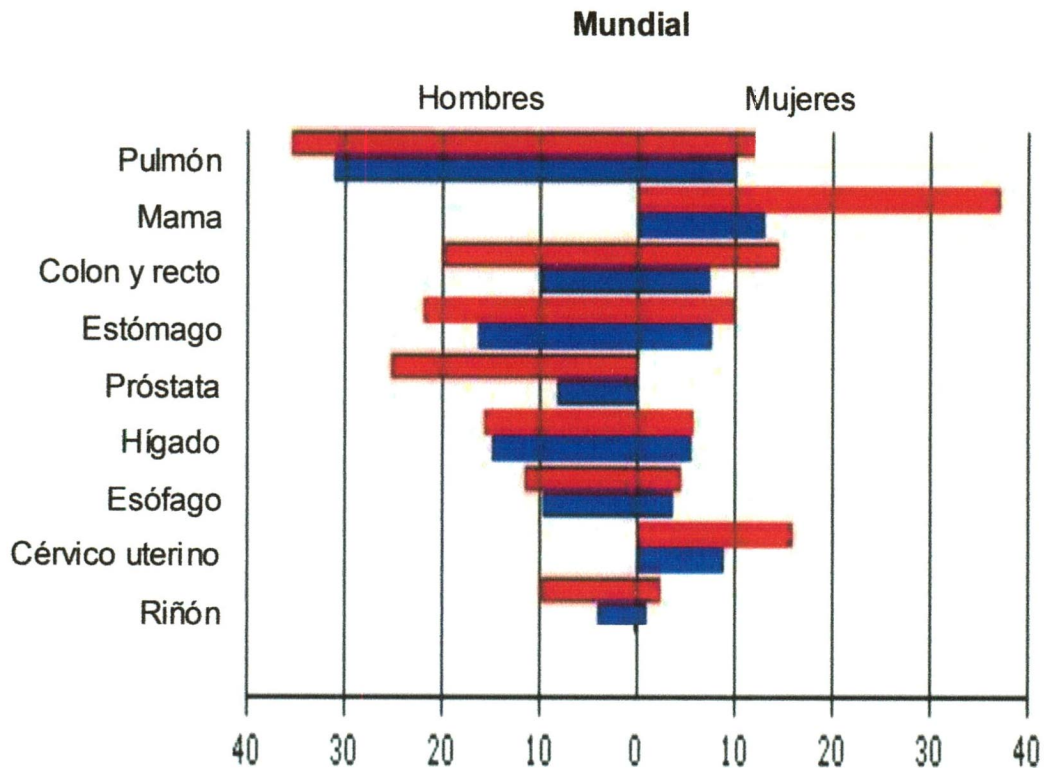
Cuando estos datos son analizados considerando el género masculino, el cáncer de pulmón posee la mayor incidencia y mortalidad. En el caso de mujeres, es el cáncer de mama la neoplasia que ocupa este puesto <sup>5, 23</sup>.

### 1.4. Cáncer de mama: estadísticas mundiales de incidencia, prevalencia y mortalidad

Como se ha mencionado antes, los datos de la Agencia Internacional para la Investigación en cáncer reportados en la base de datos Globocan <sup>23</sup>, revelan que el cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia y

mortalidad entre las mujeres del mundo (Figura 1). Acorde a esta base de datos, durante el 2008 se diagnosticaron un aproximado de 1,38 millones de nuevos casos de cáncer (23% de todos los cánceres en mujeres), ocupando así, el segundo lugar general (10,9 %) de los cánceres diagnosticados de *novo* (Figura 2A). De acuerdo al registro CI5 I-VIII (Cancer Incidence in Five Continents), la incidencia del cáncer de mama ha aumentado en promedio, pasando de una tasa ajustada por edad o ASR=40 en 1960, a cerca de una ASR=70 en 1995 (Incidencia por cada 100,000 mujeres), por lo que se puede afirmar que la incidencia aumenta año con año en todos los países <sup>24</sup>. En los últimos cinco años, el cáncer de mama se ha posicionado como la neoplasia más común en mujeres, tanto en las regiones desarrolladas, como en vías de desarrollo, con alrededor de 690,000 nuevos casos estimados en cada región. Las tasas de incidencia varían de 19,3 por 100,000 mujeres en el este de África a 89,7 por cada 100,000 mujeres en Europa occidental, y son altas (superiores a 80 por 100,000) en las regiones desarrolladas del mundo (excepto Japón) y bajas (menos de 40 por 100,000) en la mayoría de las regiones en desarrollo.

Por otra parte, aun considerando todos los tipos de neoplasia tanto en hombres como en mujeres, el cáncer de mama es el de mayor prevalencia mundial (casos existentes), con un total de 5,189,028 mujeres que han padecido esta enfermedad durante los últimos cinco años (Figura 2B) <sup>5, 23, 24</sup>.

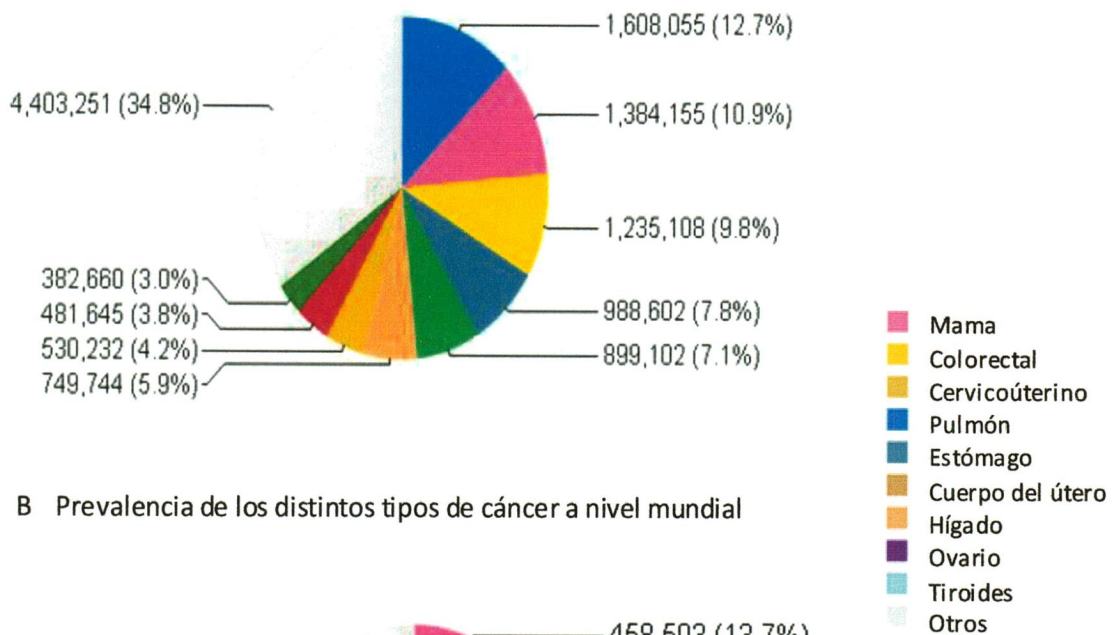


Incidencia ■ Tasa estandarizada por edad por cada 100,000 personas  
 Mortalidad ■ Todas las edades. Fuente: Base de datos Globocan 2008.

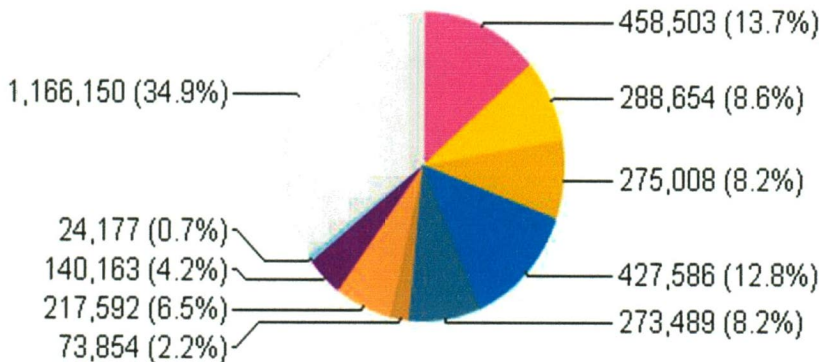
**Figura. 1. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial en cada género.** El gráfico muestra las tasas de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer más frecuentes en hombres y mujeres alrededor del mundo. En el caso de las mujeres, es evidente que el cáncer de mama es la neoplasia con la mayor incidencia y mortalidad en ese género.



A Incidencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial



B Prevalencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial

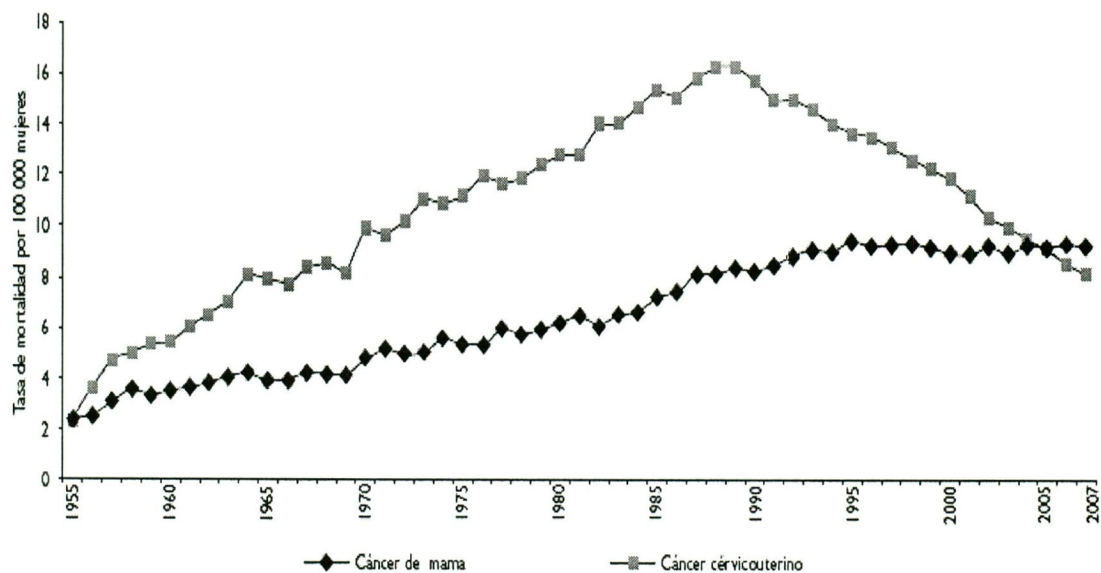


**Figura 2. Incidencia y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en ambos sexos a nivel mundial.** (A) La gráfica muestra la incidencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial, entre ellos observamos como el cáncer de mama se ha logrado colocar como el segundo cáncer más diagnosticado en el mundo entre todos los tipos de cáncer. (B) La gráfica muestra la prevalencia de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial, entre ellos observamos como el cáncer de mama es el más prevalente entre todos los tipos de cáncer. Fuente: Base de datos Globocan 2008 <sup>23</sup>.

En cuanto a la tasa de mortalidad, el ASR es de 6 a 18 (por cada 100.000 mujeres) en las regiones desarrolladas y ASR= 10 en las regiones en desarrollo, siendo el cáncer de mama, la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres tanto en los países desarrollados (269 000 defunciones) como en las regiones en desarrollo, (189 000 muertes). Estas variantes en la tasa de mortalidad, explican por qué, a pesar de ser el segundo cáncer con más incidencia y el de mayor prevalencia, el cáncer de mama se sitúa como la quinta causa de muerte por cáncer (sin considerar el género), reportando durante el 2008 más de 458 000 defunciones. En conclusión, los datos muestran una realidad preocupante: en la mujer, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. En el año 2005 la OMS calculó que en los últimos 20 años han muerto un total de 7.6 millones de mujeres a causa de esta enfermedad <sup>5, 23, 24</sup>.

### **1.5. Estadísticas del cáncer de mama en México.**

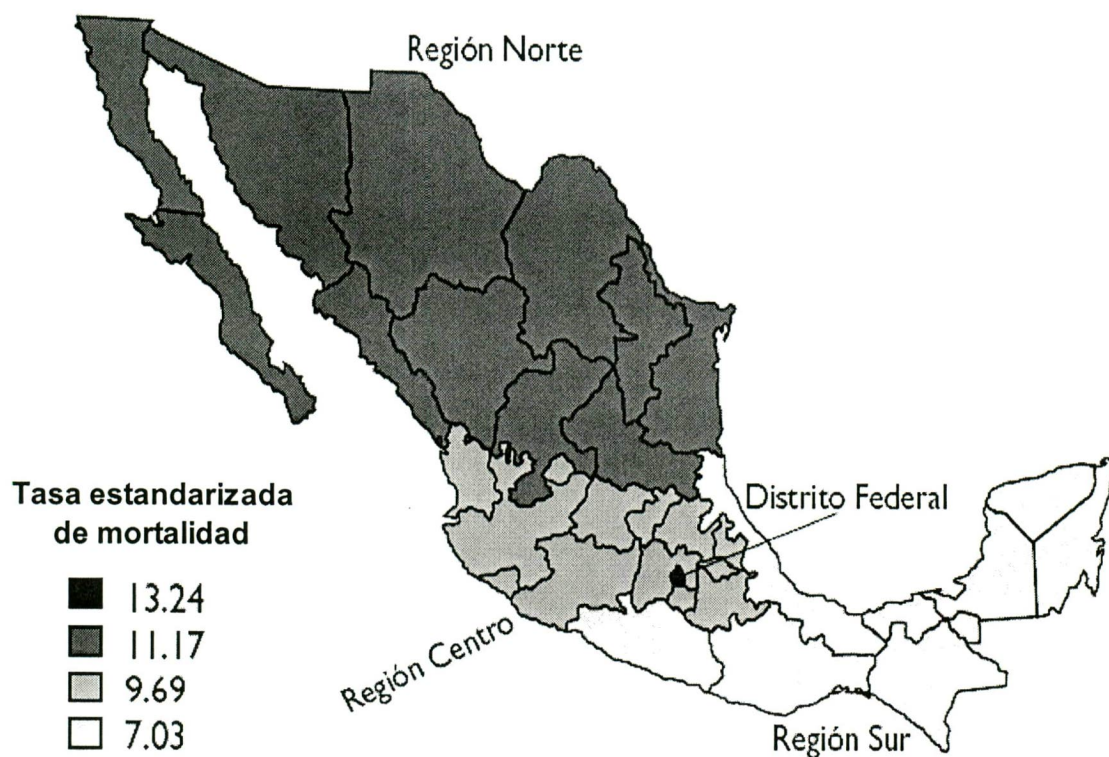
En nuestro país, los datos reportados por el IMSS <sup>25</sup> durante la última década posicionaron al cáncer de mama como el segundo lugar entre las causas de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, precedido por el cáncer cervico uterino. Sin embargo, las cifras brutas de defunciones por cáncer de cuello del útero muestran desde el año 2000 una tendencia decreciente constante, mientras que las causadas por cáncer de mama aumentan cada año, y para el año 2006 el cáncer de mama pasó a ser la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (figura 3) <sup>26</sup>.



**Figura 3. Tasa de mortalidad en mujeres mexicanas por cáncer cervicouterino y cáncer de mama.** En la gráfica se muestra la mortalidad registrada desde 1955 al año 2007 por ambas enfermedades. Se aprecia que a partir del año 2006 el cáncer de mama se sitúa como la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país. Tomada de Anuario estadístico de INEGI <sup>26</sup>.

Los reportes más actuales en México establecidos por la organización SIPAM (Salud Integral Para la Mujer A.C) indican que hace 10 años las muertes anuales por cáncer de mama eran de aproximadamente 3,026 mujeres y para el año 2007 hubo un promedio de 4,200 muertes por esta enfermedad; lo cual significa un aumento de un 38% en una década <sup>27</sup>. Esto concuerda con las tendencias de aumento del cáncer de mama que se venían presentando con anterioridad en algunos estados de nuestro país, un ejemplo es el estado de Jalisco, en donde el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mortalidad en mujeres desde 1997, con una tasa estandarizada de mortalidad del 15.82% por cada 100.000 mujeres <sup>28</sup>. Estas diferencias regionales en la prevalencia de cáncer de mama en nuestro país, muestran una mayor frecuencia de cáncer de mama en los estados del norte y centro del país, donde las mujeres gozan de un estado socioeconómico y cultural más elevado, mientras que en los estados donde predomina la población indígena y de menor nivel socioeconómico (por ejemplo: Chiapas, Oaxaca) la frecuencia es mucho más baja, mientras que en la ciudad de México se presentan el mayor número de casos (figura 4) <sup>29</sup>. Estas diferencias en la mortalidad pueden deberse a varios factores como los ambientales, el estilo de vida y la divergencia genética de la población mexicana <sup>25-26, 28-29</sup>.

Cabe señalar que los datos estadísticos proporcionados por la base de datos Globocan <sup>23</sup> sobre el cáncer de mama en nuestro país, muestran que



**Figura 4. Tasa estandarizada de mortalidad por cáncer de mama en las regiones geográficas de México.** La figura muestra las diferentes tasas de mortalidad por cáncer de mama registradas durante el año 2005 en las principales regiones geográficas de nuestro país <sup>29</sup>.

durante el año 2008 este padecimiento tuvo el primer lugar en incidencia (13,939), prevalencia (51,497) y mortalidad (5217) de todos los tipos de cáncer en mujeres mexicanas.

En la tabla I se resumen estas cifras nacionales y se comparan con otras regiones del mundo. Encontrando que en los países más desarrollados, el número de nuevos casos de cáncer de mama (Incidencia) es mayor que en los países pobres, pero de manera contraria el número de muertes (Mortalidad) es mayor en estos últimos <sup>23</sup>. Esto muestra el efecto reductor en la mortandad debido al acceso a procedimientos oportunos de detección y tratamientos presentes en los países industrializados y muy probablemente, también refleje la influencia del estilo de vida en la incidencia de cáncer de mama, como pueden ser los patrones reproductivos y de alimentación <sup>25, 29</sup>.

#### **1.6. Factores de riesgo en cáncer de mama.**

Hasta el momento no se conoce algún agente causal del cáncer de mama, sin embargo existen elementos denominados factores de riesgo que pueden presentarse solos o en conjunto y favorecer el desarrollo del cáncer. Estos factores pueden estar presentes durante largos periodos de tiempo y comprenden elementos intrínsecos (como la herencia genética) y extrínsecos (como las hábitos alimenticios y paridad). Aunque se conocen muchos factores de riesgo que se han asociado al cáncer de mama la evidencia con la que se

**Tabla 1. Comparación del cáncer de mama en México y el mundo.**

<b>Países o región</b>	<b>Nuevos casos</b>	<b>Muertes</b>	<b>ASR de Mortalidad</b>
Mundial	1,384,000	458,000	12.4
Desarrollados	692,000	189,000	18.1
En desarrollo	691,000	269,000	10.3
México	13,939	5,217	10.1

Fuente: Base de datos Globocan 2008 <sup>23</sup>.

Resumen de datos que muestra la comparación entre el número de nuevos casos, muertes y ASR de mortalidad (por cada 100,000 mujeres) de cáncer de mama durante el 2003-2008 en México y el mundo.

cuenta no es suficiente para identificar a las personas más susceptibles a padecer esta enfermedad <sup>5, 30-34</sup>.

Dentro de los factores de riesgo más conocidos se encuentran la menstruación, la menopausia y la edad avanzada. Durante el tiempo denominado ventana estrogénica comprendido entre la edad de inicio de la menstruación y menopausia, la exposición a estrógenos es continua lo cual es un factor crítico de la carcinogénesis. Esto se relaciona directamente con la edad debido a que la incidencia de cáncer de mama se incrementa duplicándose cada 10 años hasta la menopausia. Por otra parte, las mujeres que han tenido al menos un embarazo a término tienen un 25% de reducción en el riesgo de padecer cáncer de mama. Una mujer con cinco o más niños tiene aproximadamente la mitad de riesgo que una mujer nulípara. Aunado a esto, las mujeres que han amamantado a sus hijos por un total de 25 meses o más tuvieron un 33% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas quienes nunca amamantaron <sup>2-8, 28, 30-34</sup>.

Otro factor de riesgo es la herencia genética. Diversos estudios muestran que el riesgo de padecer cáncer de mama aumenta al doble cuando la mujer tiene parientes de primer grado con familiares afectados. Por otra parte, en células germinales se han identificado algunas mutaciones genéticas que predisponen a la enfermedad, estas son BRCA1, BRCA2, P53, PTEN y ATM por lo que la detección de estas variantes aumentan de forma considerable el



riesgo. Finalmente, en mujeres que han tenido cáncer de mama el riesgo de recurrencia o reaparición del primer cáncer es mayor <sup>2-8, 30-34</sup>.

Con respecto a los hábitos y costumbres que se asocian al riesgo de padecer cáncer de mama se encuentra el consumo de alcohol, el cual está asociado con un incremento moderado en el riesgo de padecer esta enfermedad. Por otra parte, la relación entre tabaquismo y cáncer de mama aún no ha sido claramente establecida aunque también se analiza una probable conexión. En cuestión de hábitos alimenticios, existe la hipótesis de que las dietas altas en grasa incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Además se ha estimado que un aumento en el índice de masa corporal incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama. En mujeres posmenopáusicas, la obesidad eleva el riesgo de cáncer de mama hasta en un 50% más que en mujeres delgadas <sup>30-34</sup>.

### **1.7. Tratamientos contra el cáncer de mama.**

Existe una gran variedad de tratamientos que dependen de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. La cirugía es la principal modalidad de tratamiento local del cáncer mamario y hay varios tipos de procedimientos quirúrgicos, el más drástico es la mastectomía radical modificada que retira toda la glándula mamaria afectada, la mayoría de los ganglios linfáticos debajo del brazo, el revestimiento de los músculos pectorales y en ocasiones parte de los músculos de la pared del pecho. Sin embargo si la enfermedad es detectada

en una etapa clínica temprana, se puede ofrecer un tratamiento conservador (tumorectomía), en el que la paciente puede conservar su seno sin comprometerse a recibir tratamiento oncológico radical <sup>2, 35</sup>.

La radioterapia es otro tipo de tratamiento que emplea generalmente rayos X de alta energía así como otros tipos de radiación con el fin de destruir células cancerosas o evitar su crecimiento. Actualmente son usados dos clases de tratamientos, estos dependen del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado. Estos se mencionan a continuación: i) El tratamiento de radioterapia externa, en la cual se envía radiación al área donde se encuentra el cáncer y, ii) la radioterapia interna, la cual consiste en administrar una sustancia radiactiva contenida en agujas, alambres o catéteres que se colocan directamente dentro del cáncer o cerca del mismo <sup>2, 35</sup>.

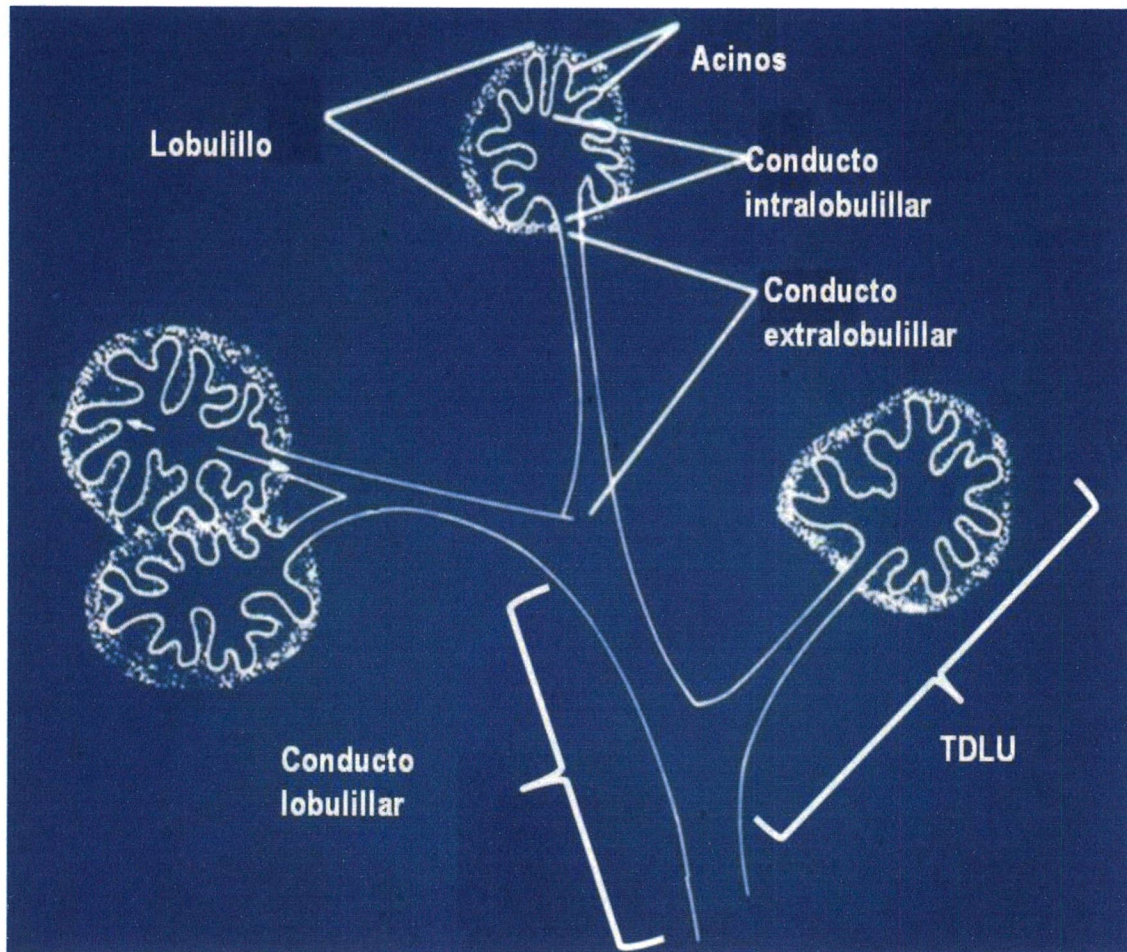
La quimioterapia es otro tipo de tratamiento que consiste en administrar medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, destruyéndolas o evitando su multiplicación. Los medicamentos son administrados vía oral, intramuscular o intravenosa. Al ingresar al torrente sanguíneo las células cancerosas son erradicadas (quimioterapia sistémica). Por otra parte, si la quimioterapia se coloca directamente o muy cercana al tumor, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esa área (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando. En los últimos

años hemos visto aparecer una serie de anticuerpos monoclonales como el bevacuzimab, lapatinib, gefitinib, etc., que se están probando en cáncer de mama y que si demuestran ser útiles se sumarán a todos los fármacos antineoplásicos en uso <sup>2, 35</sup>.

Así mismo, impedir la acción de hormonas que favorecen el crecimiento tumoral es importante para impedir el desarrollo del cáncer. El estrógeno por ejemplo, favorece el crecimiento de algunos cánceres de mama y es sintetizado en su mayor parte por los ovarios. Para impedir que los ovarios elaboren estrógeno se práctica la ablación ovárica (remoción quirúrgica de los ovarios). Finalmente, el último tipo de terapia es la hormonal que bloquea la acción de varias hormonas evitando el crecimiento de las células cancerosas. Un ejemplo de la terapia hormonal es empleo del tamoxifeno, un químico antagonista de los receptores de estrógeno (RE) que bloquea la señal de crecimiento emitida por estos receptores y que se suministra tanto a pacientes con estadios tempranos de cáncer de mama como a pacientes con cáncer metastásico de mama <sup>36</sup>. Otro tipo de terapia hormonal es aquella que se utiliza para inhibir la formación de estrógenos, esta se realiza con anastrozol y letrozol, inhibidores de la aromatasa, los cuales disminuyen el estrógeno en el cuerpo al impedir que la enzima aromatasa convierta el andrógeno en estrógeno. Se administra a mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama hormona-dependiente, el cual requiere estrógeno para crecer <sup>1, 30, 36</sup>.

### 1.8. Estructura de la glándula mamaria.

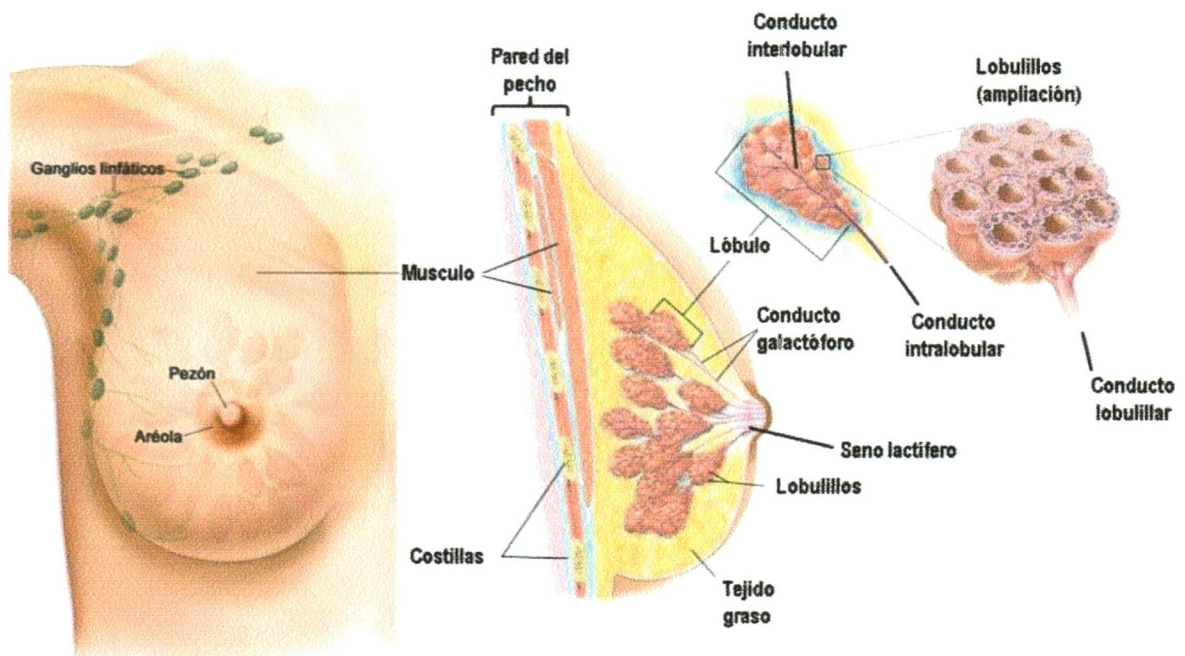
Las glándulas mamarias son los órganos encargados de producir leche en mamíferos. En el humano son dos glándulas de forma hemisférica situadas a derecha e izquierda en la parte anterior y superior del tórax, entre la segunda y sexta costilla extendiéndose hasta la axila, por delante de los músculos pectorales serrato mayor y latísimo del dorso. Existen en ambos sexos pero sólo se desarrolla en el género femenino, su tamaño varía de acuerdo a la abundancia de grasa, herencia, edad, paridad y costumbres de la mujer <sup>37, 38</sup>. Están compuestas por un parénquima glandular de estructuras de origen embrionario ectodérmico denominadas ácidos glandulares. Los ácidos son un conjunto de células alveolares secretoras que están organizadas formando una cavidad a la cual vierten la secreción láctea. Cada célula alveolar de un ácido se comporta como una unidad de secreción, e importa desde el plasma sanguíneo las proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales, minerales, anticuerpos y agua; elementos fundamentales para el producto lácteo. Un conjunto de 10 a cien ácidos se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo y vasos sanguíneos en una estructura denominada lobulillo. El lobulillo y su conducto terminal forman la Unidad Terminal Ductal Lobular (TDLU por sus siglas en inglés). El conducto terminal se divide en dos regiones; intralobulillar y extralobulillar. Las secreciones del lumen del ácido son dirigidas a través del conducto terminal intralobulillar hasta la porción extralobulillar el cual se une con sus similares para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los ácidos de un lobulillo mamario (figura 5).



**Figura 5. Estructura de la TDLU.** La figura muestra las estructura básica de la TDLU, la unidad mínima funcional productora de leche y que en conjunto forman los lobulillos. Modificado de [ucdavis.edu](http://ucdavis.edu).<sup>39</sup>

Los conductos lobulillares se unen entre sí para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de éste tipo, forma el conducto intralobular, que toma su nombre de la estructura formada por el conjunto de lobulillos conocida como lóbulo. Finalmente los conductos intralobulares se unen para formar el ducto mamario, estructuras tubulares, huecas y ramificadas que confluyen en los 15 a 24 conductos galactóforos (uno por cada lóbulo) que de manera independiente desembocan directamente al pezón. Antes de llegar a él, bajo el área de la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón. Este último es elemento que más sobresale de la glándula mamaria y está rodeado de una zona pigmentada y circular de la piel, llamada la areola, esta se hiperpigmenta con el embarazo y posee unos salientes que corresponden a glándulas sebáceas con un folículo piloso que secretan un lubricante que protege la areola y el pezón, ya que estos son muy sensibles al dolor y la irritación durante la lactancia. Los pezones están formados por fibras de músculo liso dispuestos en círculo, que comprimen los conductos galactóforos durante la lactancia y que hacen el pezón sensible a estímulos físicos. La piel que protege la estructura interna de la glándula mamaria se divide en tres zonas, la que recubre el pezón (zona mamilar), la que conforma a la areola (zona areolar) y el resto se denomina zona periférica <sup>37, 38, 40</sup>. Los esquemas en la figura 6 representan la anatomía mamaria anteriormente descrita.

## Anatomía de la glándula mamaria



**Figura 6. Anatomía de la glándula mamaria.** El esquema muestra la organización básica de la mama. Se representan las conexiones con los vasos linfáticos de la axila y la glándula mamaria, la ubicación del pezón y la aréola. La organización de los lóbulos y una ampliación del lobulillo. Tomada y modificada del National Cancer Institute (<http://www.cancer.gov/>)<sup>1</sup>.

Finalmente, por debajo de la epidermis y rodeando a la glándula mamaria se encuentra tejido de sostén o estroma, constituido por tejido conectivo fibroso y tejido adiposo que constituye en un 90% a la glándula mamaria y que ocupa los espacios interlobulares. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula mamaria sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques constituyen los ligamentos suspensorios de la mama o ligamentos de Cooper. Además del tejido de sostén, la glándula mamaria se encuentra irrigada por un sistema venoso superficial y un sistema venoso interno. El sistema venoso superficial desemboca en la vena torácica interna y en las venas superficiales de la zona baja del cuello. El sistema venoso interno se conecta con la vena axilar, el músculo pectoral y con los vasos vertebrales, la ácigos y a través de ellas con la cava superior. El sistema profundo tiene además comunicación con la red capilar pulmonar y con las venas vertebrales, vías por la cuales algunos tumores de mama pueden hacer metástasis pulmonares y óseas respectivamente. La glándula mamaria tiene además vasos y ganglios linfáticos, destacando el de la axila que recibe aproximadamente un 75 o 97% de todo el flujo linfático mamario y el de la vía torácica interna que recibe del 3 al 25%. Estos ganglios linfáticos son importantes durante los procesos cancerígenos pues en ellos se presenta de manera inicial la propagación de la enfermedad <sup>1</sup>.

37-39



## **1.9. Clasificación del cáncer de mama.**

El cáncer de mama ha sido ampliamente analizado y para facilitar su estudio se han desarrollado distintas clasificaciones de la enfermedad las cuales permiten entender las características clínicas, histológicas y moleculares del tumor de la paciente. Es importante mencionar que estas clasificaciones son utilizadas en la clínica para determinar el tratamiento, el grado de avance y hasta el pronóstico de respuesta a una terapia, por lo cual es de vital importancia comprender las diferencias entre cada una de ellas.

### **1.9.1. Clasificación del cáncer de mama por etapas clínicas.**

Para evaluar el estado de avance de algún tumor se ha desarrollado la clasificación TNM. A excepción de los tumores neuronales, esta tipificación es aplicada a la mayoría de los cánceres y se basa en las características clínicas propias del tumor como el tamaño (T), el número de ganglios afectados (N), y la presencia de metástasis (M). El conjunto de estos caracteres determina el estadio en el cual se encuentra el tumor representado por un valor numérico y sus correspondientes divisiones. La tabla dos sintetiza las características tumorales que consideran la clasificación TNM en cáncer de mama <sup>2, 11, 18</sup>.

### **1.9.2. Clasificación del cáncer de mama en base a histopatología.**

En el caso del cáncer de mama se emplean diversos tipos de clasificación. Estas se basan en diversos elementos que incluyen desde características celulares hasta moleculares. La clasificación más general divide

todos los tipos de cáncer de mama en dos categorías; *in situ* (no invasivos), e infiltrantes (invasivos y agresivos), que a su vez son subclasificados en base al origen histológico de los mismos. Estadísticamente se conoce que entre el 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ* y el resto a carcinomas infiltrantes. De estos últimos, aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales y el resto se encuentran en los demás subtipos histológicos<sup>2, 11, 18</sup>. Esto se encuentra representado en la tabla tres.

### **1.9.3. Clasificación del cáncer de mama en base a marcadores hormonales.**

Otra clasificación tumoral se basa en la expresión del receptor de estrógenos (RE), del receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (Her2). Dentro de esta clasificación tenemos 3 grupos: i) Luminal, que a su vez se subdivide en dos grupos: Luminal A, que carece de Her2, y Luminal B o triple positivo ii) Her2+, que se caracteriza por sobreexpresar sólo este tipo de receptor y iii) triple negativo debido a que no presenta la expresión de ninguno de los 3 marcadores<sup>1, 18, 43</sup>. La tabla cuatro muestra la clasificación de los tumores de mama con base en la expresión de los receptores RE, RP y Her2.

**Tabla 2. Características de los tumores mamarios según el estadio tumoral.**

Estadio	Tamaño	Nódulos ganglios	Metástasis
0	<i>In situ</i>	Sin afectación	Sin evidencia
I	≤ 2 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIA	≤ 2 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	+ 2 y 5 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIB	+ 2 y 5 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	> 5 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIIA	Sin evidencia de tumor primario	Fusión ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
	+ 2 y 5 cm	Fusión ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
	> 5 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	> 5 cm	Fusión ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
IIIB	Cualquier tamaño, infiltra directamente la pared torácica, la piel, ambas o carcinoma inflamatorio	Sin afectación o afectación ganglionar axilar o Fusión ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
IIIC	Cualquier tamaño, afectación infraclavicular, o de la arteria mamaria interna	Afectación simultánea axilar, o supraclavicular independiente de la afectación de la arteria mamaria interna	Sin evidencia
IV	Cualquier tamaño	Cualquier afectación ganglionar	Metástasis a distancia

Tabla 3. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.

---

<b>Carcinoma <i>in situ</i> (15-30% de los cánceres mamarios)</b>
<i>Subtipos histológicos</i>
Carcinoma ductal <i>in situ</i> 80%
Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> 20%

---

<b>Carcinoma invasor (70-85% de los cánceres mamarios)</b>
<i>Subtipos histológicos</i>
Carcinoma ductal infiltrante 79%
Carcinoma lobulillar infiltrante 10%
Carcinoma tubular / cribiforme infiltrante 6%
Carcinoma coloide (mucinoso) infiltrante 2%
Carcinoma medular infiltrante 2%
Carcinoma papilar infiltrante 1%

---

La tabla muestra los dos grandes grupos histológicos en los que se clasifica el cáncer de mama *In situ* e Invasor, así como los porcentajes de incidencia correspondientes a cada tipo <sup>2, 11</sup>.

**Tabla 4. Clasificación del cáncer de mama por marcadores hormonales.**

Tipo	Luminal	Basal (triple negativo)	Her2+
Receptores Estrógeno	Altos niveles	Negativo	Negativo
Her2	Negativo	Negativo o Baja	Positivo
Supervivencia	Mejor	Peor pronóstico	Incierto
Tratamiento	Hormonoterapia y quimioterapia. Bevacizumab (ab antiVEGF) + Paclitaxel.	No es susceptible a un tratamiento con blancos tradicionales pero es sensible a quimioterapia.	Buena respuesta a quimioterapia, 50% responde a trastuzumab. Quimioterapia adyuvante con antraciclinas y taxanos

La tabla muestra los tres grupos en que se clasifica al cáncer de mama, así como algunas de las características conocidas sobre este tipo de tumores <sup>18</sup>.

#### 1.9.4. Clasificación molecular del cáncer de mama.

La heterogeneidad molecular del CM puede ser clasificada con base a sus perfiles de expresión genómica. Los perfiles de expresión de DNA clasifican el cáncer de mama en dos grupos y cinco subtipos: i) RE+ (subtipos luminal A y B) y, ii) RE- (subtipos normal breast-like, Her2/neu+ y basal-like). Diversos estudios han validado la utilidad clínica de la clasificación molecular evaluando la recurrencia y mortalidad distante, demostrando ser más poderosa que la histopatológica como factor predictivo de los diferentes tratamientos, lo cual resulta en un uso más selectivo de la quimioterapia, y con ello la reducción la toxicidad y los costos. La tabla 5 ejemplifica la clasificación molecular del CM y algunas características propias de cada subtipo <sup>43</sup>.

Tipo	RE +		RE -		
Expresión de algunas proteínas diferenciales	Alta expresión de: GATA protein binding 3 X-box binding protein 1 trefoil factor 3 hepatocyte nuclear factor $\alpha$ LIV-13 hepatocyte nuclear factor $\alpha$ LIV-1		Alta expresión de: keratina 5, keratina 6, metalotioneina1X SFRP1  Baja expresión de: fibronectina 1 y mucina 1		
Subtipo	<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>	<b>Basal-like</b>	<b>Her2*</b>	<b>Normal breast</b>
Expresión de algunos genes diferenciales	Alta expresión: <i>c-kit</i> <i>ATF-3</i> <i>c-fos</i> <i>c-jun</i> <i>fosB</i> <i>jun-D</i>  Baja expresión:  <i>PCNA</i> <i>CDC2</i> <i>BUB1</i> <i>MAD2L1</i>	<b>Basal-like</b> Alta expresión: Proteína tirosina fosfatasa tipo IV <i>RAD21</i> <i>BAP1</i>  Baja expresión:  <i>FGFR1</i> <i>CXCR4</i> <i>ATF-3-like</i>	Alta expresión: Metaloproteinasas de matriz 7, Topoisomerasa II <i>MAD2L1</i> <i>CDC2</i> PCNA	Alta expresión: Her2+ <i>MDR1</i> , Sintasa de ácidos grasos, <i>RAL-B</i> , <i>RAB6A</i> , Fibronectina 1  Baja expresión:  <i>c-kit</i> <i>c-myc</i>	Alta expresión: <i>c-fos</i> <i>c-jun</i> <i>fos B</i> Factor activante de la transcripción 3 Caveolina 1 Caveolina 2, TGF $\beta$ RII.

**Tabla 5. Clasificación molecular del cáncer de mama.** La tabla muestra la división principal y los subgrupos más reconocidos de acuerdo a los resultados de expresión genómica utilizando microarreglos de DNA. Se enlistan algunas proteínas y genes característicos expresados en los tumores de cáncer de mama.

### 1.10. Los microRNAs son reguladores de la expresión génica.

Los miRNAs son una familia de pequeños RNAs monocatenarios no codificantes de 21-25 nucleótidos, que se relacionan con los RNAs interferentes (RNAi) y regulan la expresión génica al inhibir la traducción o inducir la degradación de los RNAs mensajeros (RNAm) blanco <sup>44</sup>. Fueron descubiertos en 1993 por Víctor Ambros en el organismo *Caenorhabditis elegans* <sup>45</sup>. Son productos de áreas del genoma humano que previamente se consideraban sin función y se cree que se originaron como una defensa del hospedero contra el material genético extraño, como los virus de RNA y elementos de transposición; además han sido identificados en vertebrados, artrópodos, plantas y organismos unicelulares <sup>46, 47</sup>. Las diferencias con otras moléculas de silenciamiento como los RNAi, indican que mientras estas actúan como elementos de defensa contra ácidos nucleicos exógenos, la principal función de los miRNAs es la regulación transcripcional. Además de que los miRNAs son transcritos en horquillas, mientras que los RNAi son RNA dúplex y solo son capaces de silenciar el mismo transcrito del cual se generaron, mientras que los miRNAs tienen capacidad de regular la expresión de un número variable de mensajeros que pueden ser distintos al mensajero del cual se originaron <sup>44</sup>. Estimaciones del número total de miRNAs humanos calculan más de 1000 distintas moléculas y en el año 2005 se consideró que un solo miRNA puede influir en la producción de al menos 200 proteínas distintas <sup>48</sup>. Dado el número actual caracterizado de miRNAs, la extrapolación de estos datos indica que cerca de una tercera parte de todas las proteínas humanas pueden estar



reguladas por miRNAs <sup>49</sup>. De acuerdo a la potencialidad de los miRNAs para regular la expresión de múltiples genes celulares, no es ninguna sorpresa que los miRNAs desempeñen un papel importante en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo, la diferenciación, proliferación, apoptosis, respuesta a estrés, el metabolismo de ácidos grasos y la secreción de insulina <sup>50</sup>.

La importancia de la regulación en la expresión de los miRNAs, ha quedado evidenciada al encontrar que cambios en la modulación de estos genes se relacionan con el cáncer y diversos padecimientos. Estas alteraciones, encontradas a través de perfiles de expresión en biopsias y la reciente descripción de miRNAs en plasma y suero humanos, demuestran un gran potencial para ser utilizados como una nueva clase de biomarcadores en el diagnóstico de cáncer y otras enfermedades <sup>51, 52</sup>. Por otra parte, Zhang L. 2012 <sup>53</sup>, ha descrito la presencia del miR-168a adquirido de forma exógena por la dieta de arroz, en el suero de ratones. En ensayos *in vitro* con células humanas, este miRNA regula la expresión de la proteína LDLRAP1, la cual se expresa fuertemente en hígado y remueve los lípidos de baja densidad del sistema circulatorio, esto sugiere que los miRNAs ingeridos en la dieta pueden regular la expresión génica en células humanas. La alteración de los miRNAs en diversas enfermedades como el cáncer y la posibilidad de su modulación exógena, recalcan la trascendencia de comprender los mecanismos que regulan la expresión génica de los miRNAs.

### 1.11. Nomenclatura de los miRNAs.

El nombre de un miRNA suele estar compuesto de cuatro elementos separados por un guión por ejemplo hsa-miR-130b-3p. Las primeras tres letras hacen referencia a la especie de origen; hsa (*Homo sapiens*), mmu (*Mus musculus*), eca (*Equus caballus*), etc. El subfijo "mir" con minúsculas, se refiere al gen o la forma precursora o de un miRNA, mientras "miR" con la consonante R mayúscula se refiere a la forma madura. El número de un miRNA es asignado de manera secuencial conforme los miRNAs son descritos. Los miRNAs con secuencias casi idénticas exceptuando uno o dos nucleótidos, se nombran con una letra minúscula adicional. Por ejemplo, el miR-130a localizado en el cromosoma 11, está estrechamente relacionado con el miR-130b, que se encuentra en el cromosoma 22. En el caso de los pre-miRNAs que originan miRNAs maduros 100% idénticos pero que están situados en diferentes lugares del genoma se indican con un número adicional. Por ejemplo, tenemos el caso del hsa-mir-194-1 localizado en el cromosoma uno y el hsa-mir-194-2 que se localiza en el cromosoma once.

Por último, cuando un miRNA en el proceso final de su biogénesis es separado de su cadena complementaria, esta última se señala con un asterisco después del nombre, lo que indica que ese miRNA\* se expresa en niveles bajos en relación con el miRNA del brazo opuesto de la horquilla. Esta última connotación está siendo modificada y actualmente cuando dos microRNAs maduros se originan de los brazos opuestos del mismo pre-miRNA, se denotan

con el subfijo 3p o 5p. Por ejemplo, hsa-miR-21 y hsa-miR-21\* comparten la misma horquilla del pre-miRNA y son referidos como hsa-miR-21-5p (hsa-miR-21) y hsa-miR-21-3p (hsa-miR-21\*). Es importante señalar que los miRNAs\* no siempre corresponden al brazo 3p, por ejemplo el hsa-miR-132\* corresponde al hsa-miR-132-5p. Esto se debe a que la adquisición del símbolo \* era determinado por los niveles relativos de expresión, nombrando miRNA maduro al miRNA con mayor abundancia independientemente de la posición del brazo en que fuera localizado.

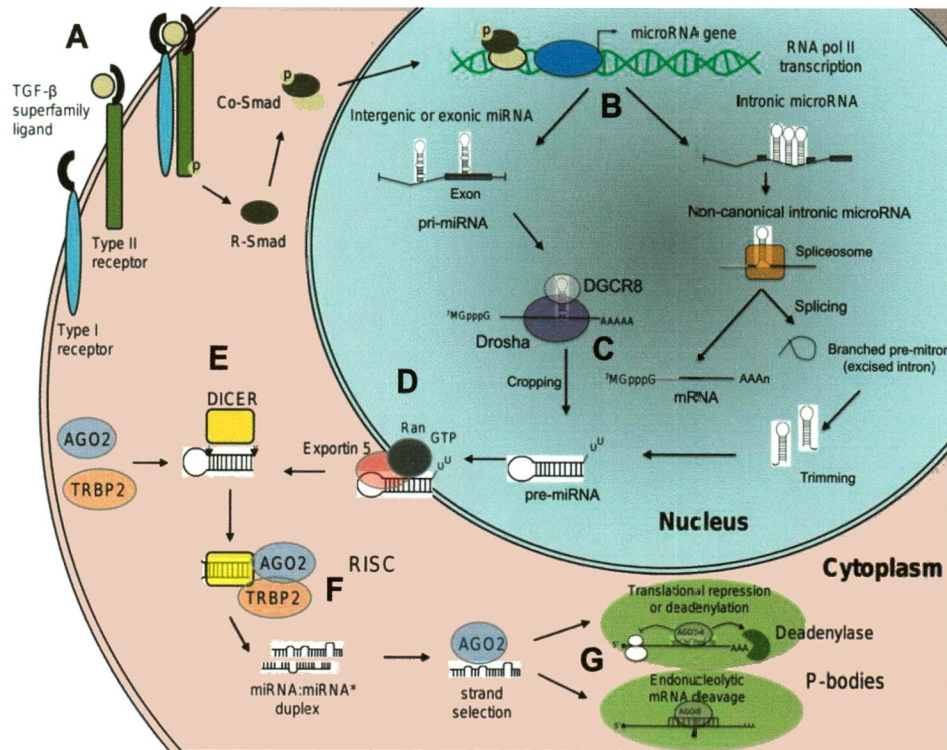
### 1.12. Biogénesis de los miRNAs.

Para comprender como los miRNAs llevan a cabo su función de reguladores de la expresión génica, es necesario conocer la biogénesis de estas moléculas. Los genes que codifican a los miRNAs se localizan en regiones diferentes del genoma y su transcripción puede estar regulada independientemente por promotores específicos como en el caso del clúster mir-23a-27a-24-2<sup>54-55</sup>. Sin embargo, la mayoría de los precursores de miRNAs están presentes en intrones y tienen la misma orientación del gen hospedero, por lo que son co-transcritos como parte del RNAm. En algunos casos, los miRNAs se traslapan o están integrados con exones de los transcritos, sin embargo en estos casos, están siempre en la misma orientación de transcripción y se pueden encontrar también en las regiones no-codificantes 5'-o 3'-UTRs. El resto de los miRNAs (una tercera parte de ellos) se encuentran dentro de regiones intergénicas en clústers codificados como un transcrito

policistrónico, lo que hace suponer una acción coordinada en diversos procesos<sup>56</sup>. Los miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II en transcritos de 1000 nucleótidos hasta varias kilobases, además de poseer CAP 5' y ser poliadenilados en su extremo 3'<sup>57</sup>. Estos transcritos conocidos como pri-miRNAs pueden ser policistrónicos conteniendo dos o más miRNAs. El pri-miRNA contiene regiones que tienen la capacidad de formar una estructura bicatenaria de tallo burbuja de aproximadamente 80 pares de bases que dará origen al miRNA. Esta estructura es reconocida y liberada por el complejo microprocesador conformado por Drosha, una enzima RNasIII y la proteína DGCR8 generando precursores de 70-100 pares de bases llamados pre-miRNAs. La formación de los pre-miRNAs ocurre después de que el intrón ha sido separado del gen hospedero mediante el proceso de splicing.

El pre-miRNA es una secuencia conformada de una estructura tallo burbuja con una prolongación introducida por Drosha de dos nucleótidos en su extremo 3', a la cual se le especulan las funciones de indicar cuál es la cadena guía o de señalar la presencia de un RNA de doble cadena como elemento celular propio o bien servir como motivo de reconocimiento para la exportina 5. Estos pre-miRNA son transportados al citoplasma, mediante la exportina 5 y el cofactor Ran-GTP<sup>58</sup>. En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por DICER, otra enzima del tipo RNasIII, que en conjunto con la proteína TRBP (Transactivating response RNA- Binding Protein) recorta por fuera de la horquilla y genera un RNA de doble cadena imperfecto (miRNA/miRNA\*).

Posteriormente TRBP recluta la proteína argonauta 2 (AGO2) al complejo miRNA/miRNA\*-DICER, formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) <sup>59</sup>. La cadena complementaria o estrella (\*) del dúplex miRNA/miRNA\* es liberada por AGO2. La estabilidad termodinámica en el extremo 5' del miRNA determina que cadena es guía y cuál es la complementaria. Mientras la cadena pasajera es rica en C y U, la cadena guía es abundante en A y G, lo que favorece la generación de estructuras secundarias que facilitan su incorporación al complejo proteico RISC <sup>60</sup>, el cual une el miRNA a su RNAm blanco, localizándolo por escaneo del transcrito. La unión del miRNA con su blanco depende de la hibridación exacta de la "región semilla" con el mensajero. Esta región comprende los nucleótidos 2-7 en la porción 5' del miRNA. Una base no apareada de forma correcta en la región semilla impide la unión del miRNA con el RNAm. Si el miRNA es unido al RNAm de forma correcta, la regulación en la expresión se propicia con base a la complementariedad del resto de la secuencia del mRNA. Si ésta es complementaria al 100%, el RNAm blanco es degradado. Si no es así, se genera una estructura conformacional en forma de "A" que no permite que AGO2 entre en contacto directo con el RNAm, por lo cual no se lleva a cabo la degradación del transcrito pero sí la represión traduccional. Finalmente, los miRNAs podrían silenciar los RNAm mediante un mecanismo ligado al secuestro del mensajero hacia los complejos citoplásmicos denominados P-bodies o cuerpos de procesamiento donde los transcritos pueden ser degradados o almacenados <sup>61</sup>.



**Figura 7. Biogénesis de miRNAs.** (A) La transcripción de los genes de miRNA podría ser regulada por factores de transcripción, en respuesta a múltiples señales en este ejemplo por la citocina TGF- $\beta$ . (B) Los microRNAs primarios (pri-miRNAs) son transcritos por la RNA polimerasa II. Estos pueden provenir de regiones intergenicas, exonicas o intronicas a partir del proceso de ensamble alternativo. Los pri-miRNAs pueden ser poliadenilados y poseer CAP. (C) Los pri-miRNAs son procesados por Droscha, una enzima RNasa III y convertidos a pre-miRNAs de  $\pm 70$  nucleótidos, que se caracterizan por tener una estructura dúplex imperfecta. (D) Los pre-miRNAs son transportados del núcleo al citoplasma por la exportina-5 y Ran-GTP. (E) En el citoplasma, los pre-miRNAs son transformados por Dicer, otra enzima del tipo RNasa III, generando la estructura híbrida miRNA/miRNA\*. (F) La unión de las proteínas AGO2 y TRBP2 al complejo DICER-miRNA/miRNA\* forma el complejo RISC. En este momento la proteína AGO2 libera el miRNA\*. El miRNA dirige la asociación de RISC a sitios específicos en la región 3' no traducida del RNAm blanco. (G) Si el apareamiento de bases entre el miRNA y su RNAm blanco es perfecto, la función endonucleolítica de la Argonauta 2 rompe el RNAm, llevándolo a su rápida destrucción. La complementariedad imperfecta lleva a la represión traduccional o causar inestabilidad del RNAm mediante un mecanismo de deadenilación. Los mensajeros pueden ser degradados o almacenados en las estructuras denominadas P-bodies. (Modificada de López Camarillo C. *et al.* 2013)<sup>62</sup>.

### 1.13. Funciones de los miRNAs.

En general, la mayoría de los miRNAs actúan como reguladores negativos de la expresión génica, mediante represión traduccional o la degradación del RNAm a través de su unión con sus sitios blanco en la región 3' no codificante de los RNAm. De manera más específica, diversos estudios en modelos animales han revelado funciones esenciales de los miRNAs en el control del desarrollo. Algunos miRNAs exhiben un patrón de expresión temporal o tejido específico, lo cual sugiere que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de los tejidos y órganos, así como en su función y mantenimiento <sup>63</sup>. En *Caenorhabditis elegans*, los miRNAs lin-4 y let-7 controlan el tiempo de desarrollo larvario, mientras que el miRNA lsy-6 es importante en el desarrollo neuronal <sup>64</sup>. En *Drosophila melanogaster*, el miRNA bantam regula el desarrollo promoviendo la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis a través de la modulación de la expresión del gen pro-apoptótico *hid* <sup>65</sup>. En los mamíferos, se ha demostrado que los miRNAs regulan la diferenciación celular en diversos tejidos. Por ejemplo, miR-181 modula la diferenciación del linaje hematopoyético <sup>66</sup>. miR-223 regula la granulopoyesis en humanos mediante una vía que involucra los factores de transcripción NFI-A y la proteína  $\alpha$  de unión al enhancer CCAAT <sup>67</sup>. Otros ejemplos son el miR-1 y miR-133 los cuales promueven la miogénesis y la proliferación de mioblastos <sup>68</sup>. Los miR-124a y miR-9 específicos de cerebro, participan en la diferenciación neuronal en células madre embrionarias <sup>69</sup> y el miR-143, está implicado en la diferenciación de adipocitos humanos <sup>70</sup>.

Además, los miRNAs regulan el crecimiento celular, por ejemplo, los miR-15a y miR-16 están involucrados en apoptosis, así como el clúster miR-17-92 el cual participa en el control de la proliferación celular y la angiogénesis en cáncer<sup>71-72</sup>.

#### **1.14. miRNAs y cáncer.**

Como se ha visto, la función de los miRNAs es fundamental en una amplia gama de procesos celulares, por lo que alteraciones en la expresión de los miRNAs pueden contribuir de manera significativa en diversos procesos patológicos tales como el desarrollo del cáncer. La desregulación de los miRNAs puede ocurrir en varios niveles, por ejemplo, a nivel traduccional, donde un aumento en la transcripción de los genes de miRNA puede ser ocasionado por un incremento en el número de copias de estos genes, así como en el caso contrario, donde una expresión aberrante ocasionada por una delección puede influir en la síntesis de los genes de miRNAs<sup>73</sup>. Así mismo, el estado de metilación de los genes de miRNAs y cambios en la actividad de los factores transcripcionales que regulan su transcripción, pueden ser tan sólo algunas causas por las cuales los niveles de expresión de los miRNAs pueden verse afectados<sup>74</sup>. Los miRNAs también pueden ser desregulados como resultado de anomalías específicas o globales de su maduración, principalmente por alteraciones en las proteínas AGO2 y DICER<sup>75</sup>.



La asociación entre la expresión de miRNAs y el cáncer fue más evidente al determinar que un gran número de genes que codifican para miRNAs están en regiones que comúnmente sufren alteraciones cromosómicas en un proceso cancerígeno. Más de 186 genes de miRNAs se encuentran en regiones del genoma asociadas con cáncer, por ejemplo las regiones mínimas de pérdida de heterocigosidad, las regiones mínimas de amplificación y con menos frecuencia, las regiones cromosómicas de ruptura, lo que sugiere que las alteraciones genómicas, en particular la amplificación génica o deleciones, pueden ser un mecanismo importante que explica la desregulación en la expresión de miRNAs en esta patología <sup>76</sup>.

#### **1.15. Oncomirs; miRNAs como oncogenes y supresores de tumor.**

Independientemente de la causa que origine la alteración en la expresión de un miRNA, aquellos miRNAs asociados con el desarrollo tumoral son conocidos como oncomirs. Estos pueden funcionar como oncogenes o bien como supresores de tumor. En el caso de un miRNA funcionando como oncogen podemos mencionar el caso del miR-21, el cual regula la expresión de la proteína PDCD4 <sup>293</sup>, cuya función es inducir la muerte celular programada. La sobreexpresión del miR-21 por una ampliación génica tiene como consecuencia la disminución de la proteína PDCD4 por lo que las células tumorales son capaces de evitar el proceso de apoptosis y favorecer la oncogénesis.

Por el contrario, la baja expresión de un miRNA que funciona como supresor de tumor controlando la expresión de un proto-oncogen puede conducir a la acumulación excesiva de su blanco favoreciendo la oncogénesis. Por ejemplo la represión del hsa-miR-17 en tumores pulmonares, tiene como consecuencia el incremento en la expresión de la proteína RAS, lo que conlleva a un incremento en la proliferación celular <sup>292</sup>.

En resumen, los desequilibrios en los proto-oncogenes o supresores de tumor causados por alteraciones en miRNAs, pueden promover la proliferación celular, disminuir la apoptosis y estimular la angiogénesis, procesos fundamentales en la formación de tumores <sup>75, 293</sup>. Lo anterior ha sido demostrado en diversos trabajos que han reportado las alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs de diversos tipos de cáncer. En el año 2003, Michael *et al.*, <sup>77</sup> analizó muestras de tumores colorectales, encontrando diferencias en la modulación de miRNAs entre el tumor y el tejido normal, mientras que Calin *et al.*, en el 2004 <sup>78</sup> y 2005 <sup>79</sup> encontró que la expresión de miR-15 y miR-16 se altera en leucemia, y se asoció la expresión de estos miRNAs con la progresión de esta enfermedad. En otro reporte, Ciafre *et al.*, 2005 <sup>80</sup>, analizó la expresión de los miRNAs en glioblastoma encontrando alteraciones en estos tumores. He *et al.*, 2005 <sup>81</sup> asoció la alteración de algunos miRNAs con el carcinoma de papilar de tiroides; mientras que Iorio *et al.*, 2005 <sup>82</sup> analizó y observó por primera vez las alteraciones en la expresión de miRNAs en cáncer mamario. Lu *et al.*, 2005 <sup>83</sup> evidenció que los perfiles de

expresión genómica de miRNAs permiten clasificar los tumores según el origen celular; mientras que Calin en el 2006 <sup>84</sup>, logró determinar diversas firmas moleculares en distintos tipos de cáncer humano. Por otra parte, Murakami *et al.*, en el 2006 <sup>85</sup>, analizó los perfiles de expresión de carcinomas hepáticos y tejido hepático no tumoral evidenciando claras diferencias de expresión de miRNAs entre ellos. Pallante *et al.*, <sup>86</sup> en ese mismo año, evidenció la desregulación de miRNAs en carcinomas de tiroides. También en el 2006 tres análisis más fueron publicados, Roldo *et al.*, <sup>87</sup> correlaciona la expresión de miRNAs de tumores pancreáticos y tumores acinares con los datos clínicos. Volinia *et al.*, <sup>88</sup>, analiza distintos tipos de tumores sólidos como mama, pulmón, estómago, próstata, colon y páncreas, encontrando que existen varios miRNAs expresados de manera similar entre ellos, pero evidenciando también claras diferencias características de cada tumor. Así mismo, Yanaihara *et al.*, <sup>89</sup> propone un perfil molecular único, que permite diagnosticar y predecir el desarrollo del cáncer de pulmón. En el año 2007, Bloomston *et al.*, <sup>90</sup> utilizó los perfiles de expresión para diferenciar adenomas pancreáticos de la pancreatitis crónica y del tejido normal.

Estos datos señalan de manera contundente la alteración de miRNAs en el desarrollo tumoral y nos muestran claramente la importancia de conocer los perfiles de expresión genómica de los miRNAs en los tumores, lo cual nos permite un mayor entendimiento de la biología y heterogeneidad del cáncer.

## 2. Estado del Arte.

### 2.1. El cáncer de mama en México.

A nivel mundial la edad promedio de las pacientes con cáncer de mama es alrededor de los 65 años <sup>29</sup>, esto contrasta de forma alarmante con los datos reportados en nuestro país, donde el promedio es de 55 años, es decir una década antes <sup>30</sup>. Aunado a esto hay que tomar en cuenta dos aspectos importantes que acentúan éste panorama; el primero es que la enfermedad afecta mujeres en prácticamente todas las edades y el segundo, es que la población no sólo en México, sino a nivel mundial, se vuelve más vieja, lo que quiere decir que en un periodo no muy lejano la población femenina en edad de riesgo será alta. También es conveniente mencionar que los programas de control poblacional y planificación familiar actuales alientan la baja paridad y un aplazamiento de los embarazos, que como se ha visto es un factor de riesgo para el cáncer de mama <sup>29-33</sup>. Esto tiene serias implicaciones en la epidemiología de la enfermedad en nuestro país.

En adición a esto, en el año 2000 la Secretaría de Salud realizó la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA-2000), la cual tuvo como objetivo indagar las condiciones de salud y los patrones de uso de los servicios de salud en la población mexicana por edad y sexo. Acorde con los datos arrojados por la encuesta, de los casi nueve millones de mujeres que representa la ENSA-2000, las mujeres derechohabientes que acuden a la detección de cáncer de mama tienen algún grado de escolaridad, y solo el 4.6% de ellas son

analfabetas, esto sugiere que el aspecto cultural es importante debido a que existen muchas mujeres que no conocen como realizar una autoexploración, o desconocen la trascendencia real de esta. También se encontró que de la totalidad de las pacientes atendidas, sólo el 20% de las mujeres presentaron algún tipo de molestia que las llevó a realizarse la prueba de detección de cáncer de mama, mientras que el 80% restante realizó una revisión rutinaria. En una muy baja proporción (4%) de estos casos fueron positivos y de esas mujeres, el 75% recibió tratamiento. Este último punto es realmente interesante pues se desconoce si el 25% restante recibió tratamiento privado o simplemente no lo recibió. Esto también es reflejo del limitado alcance que tienen los sistemas públicos de salud y cabe destacar que el estudio se limita sólo a derechohabientes a los sistemas de salud <sup>26</sup>.

Es por estas razones que el cáncer de mama es un problema de salud en la mujer que requiere de esfuerzos múltiples por parte de los servicios de salud pública. Estos resultados indican claramente que el programa de detección temprana de cáncer mamario en México es un programa con baja cobertura e insuficiente que no alcanza a toda su población blanco, además de tener poca eficacia pues las mujeres se detectan en un estado avanzado de la enfermedad por lo cual no ha sido posible reducir la mortalidad <sup>25, 26, 28</sup>.

Por otra parte, el 46% de las mujeres mexicanas con cáncer de mama detectadas por el IMSS, lo presenta entre los 40-49 años <sup>25</sup>, lo cual es contrario

con lo observado en Estados Unidos, donde la edad media de adquisición de cáncer de mama es de 63 años e igualmente dispar a lo reportado en países europeos, donde la mayor incidencia es en mujeres posmenopáusicas <sup>91</sup>.

En conclusión la elevada incidencia de este padecimiento en nuestro país se debe a la falta de una cultura de prevención sobre esta enfermedad, así como a las limitaciones de los sistemas de salud para realizar un diagnóstico claro y oportuno, razón por la cual el cáncer de mama es detectado en fases avanzadas o críticas de la malignidad reduciendo e incluso eliminando cualquier probabilidad de curación. En caso de ser detectado oportunamente el cáncer de mama puede ser curado hasta en un 90% de los casos. Asimismo, aunque las metodologías aplicadas en nuestro país parecen ser eficaces en la detección temprana del cáncer, solamente se limitan a la autoexploración mamaria efectuada esporádicamente por la mujer y a la evaluación clínica mediante una mastografía la cual no está disponible para su uso masivo. La problemática social y cultural del país, incluyendo la falta de sistemas de salud eficientes y una cultura preventiva, así como el aumento de la incidencia de esta enfermedad, hacen necesario la creación de métodos moleculares que permitan identificar a las mujeres con predisposición al cáncer o el desarrollo de herramientas que permitan la detección temprana de la enfermedad, lo cual, en conjunto con estrategias de los gobiernos locales como serían i) aumentar el acceso a la población derechohabiente, ii) incrementar la capacidad de diagnóstico de la enfermedad dentro de los servicios de salud, iii) informar e

instruir a la población en general sobre la enfermedad, permitiría identificar a la población en riesgo de padecer esta enfermedad en etapas aun más tempranas aumentando su esperanza de vida <sup>26</sup>.

Por ello las investigaciones realizadas en la búsqueda de herramientas moleculares que permitan combatir el cáncer de mama han ido tomando fuerza en nuestro país. Sin embargo, han sido pocos los estudios realizados que tratan de identificar mutaciones genómicas específicas de nuestra población, en el 2004 por ejemplo, se reportaron los cambios cromosómicos encontrados por hibridación genómica comparativa en cáncer de mama, haciendo mención de algunas deleciones particulares en las muestras analizadas<sup>92</sup>. Otros estudios han encontrado diferencias en la expresión genómica de los tumores malignos de mama respecto al tejido normal <sup>93</sup>. Además, se ha estudiado la relación de estos genes con deleciones o amplificaciones cromosómicas <sup>94</sup>. Estos datos son aún escasos e incipientes lo que resalta la necesidad de continuar con este tipo de estudios.

## **2.2. La importancia de la detección temprana del cáncer de mama.**

El desarrollo de un tumor mamario es consecuencia de múltiples alteraciones genéticas acumuladas de manera progresiva, sin corrección, y que se presentan en una sola célula que dará origen a todo un tumor el cual además, logra evadir la respuesta inmune y superar procesos biológicos que evitan el desarrollo de un tumor como la apoptosis. En resumen el cáncer no

puede desarrollarse de un defecto genético individual, por lo que necesita de diferentes etapas donde nuevas mutaciones emergen y se acumulan hasta alterar los mecanismos de crecimiento y proliferación celular<sup>1</sup>.

2  
Estas modificaciones genéticas pueden verse reflejadas en etapas muy tempranas, aun antes de que una mujer pueda detectar un crecimiento anormal en su seno (aproximadamente 0.5 mm), dichas alteraciones pueden ser la sobreexpresión o incluso la disminución o ausencia de expresión de proteínas con funciones como receptores de hormonas o factores de crecimiento, y/o de factores de transcripción que estén implicados en la regulación del ciclo celular así como en los procesos de diferenciación celular. A nivel molecular, es posible determinar las mutaciones y los cambios en la expresión de estos genes, permitiendo establecer un pronóstico del crecimiento del tumor, así como la posible resistencia al tratamiento<sup>1, 25, 103, 104, 105, 106</sup>. Aunado a esto, se ha estimado que una neoplasia de mama de 1 cm realiza aproximadamente 30 duplicaciones antes de alcanzar ese tamaño, por lo cual se infiere que este cáncer tiene unos siete años de evolución. Esta estimación sugiere la utilidad de una detección temprana con métodos capaces de visualizar alteraciones subclínicas de tamaño inferior a 1 cm. o aun mejor, la detección de alteraciones a nivel molecular, antes de que sea visible el tumor y aparezca la metástasis a tejidos cercanos<sup>25</sup>.



Para poder diseñar un método más eficiente de detección temprana del cáncer de mama, es necesario conocer la “biología” del cáncer que comprende el análisis exhaustivo de la expresión genética de células cancerosas a nivel de genes, RNAm, proteínas y su estado de fosforilación, así como miRNAs, lo que permitirá la búsqueda y la detección de “marcadores tumorales” los cuales tendrían la característica de expresarse diferencialmente aún antes de que un tumor pudiera ser detectable y tendrían múltiples aplicaciones como: clasificar un cáncer, evaluar el riesgo, la susceptibilidad, el pronóstico, dirigir una terapia personalizada y hacer un seguimiento clínico. Estos marcadores tumorales podrían ser entonces una herramienta de vital importancia en la lucha contra el cáncer de mama ya que no solo se podría detectar el padecimiento aun en etapas más tempranas sino que tienen una gran implicación médica en el desarrollo de terapias personalizadas cuando el cáncer ya se ha presentado facilitando el tratamiento y favoreciendo la curación del mismo. Así mismo, los marcadores tumorales podrían ser utilizados como una herramienta para evaluar la predisposición a padecer cáncer. La identificación de estos marcadores tumorales en células cancerosas junto con otros grandes proyectos como la caracterización de SNPs asociados a cáncer y la tipificación poblacional son estrategias complicadas y laboriosas pero que apoyarían ampliamente al menos en el contexto metodológico, a los sistemas de salud pública para efectuar una detección-prevención de padecimientos que tienen actualmente una gran incidencia en nuestro país como es el cáncer de mama <sup>48,</sup>

101, 102, 103

Un número creciente de factores clínicos, histopatológicos y moleculares son utilizados tradicionalmente como marcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama. Estos incluyen la edad de la paciente, el tamaño y grado del tumor, el estado metastásico de los nódulos linfáticos auxiliares, el tipo histológico, expresión de los receptores de estrógenos-progesterona, y de los genes que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2) <sup>107</sup>. Otros genes que se utilizan rutinariamente para tomar decisiones en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama en etapa temprana incluyen marcadores de proliferación como Ki-67, las ciclinas D1 y E, el inhibidor del activador de plasminógeno similar a la uroquinasa y la catepsina D. Otro grupo de genes afectado en carcinoma de mama hereditario, incluyen mutaciones en los genes de reparación del genoma, tales como BRCA1 y BRCA2 en aproximadamente una de cada mil mujeres <sup>108</sup>. Por otra parte, mutaciones en el gen p53 se han reportado en más de la mitad de todos los cánceres. En cáncer de mama la presencia de mutaciones en p53 se ha relacionado a un mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia y su frecuencia de mutaciones es de 20-30%, además ha sido considerado un evento temprano en el desarrollo de la neoplasia <sup>109, 110</sup>. A la fecha un número considerable de nuevos marcadores moleculares han sido estudiados para determinar su valor potencial predictivo de pronóstico y respuesta a las terapias y sólo un número pequeño de ellos son utilizados en el análisis de rutina, es en este rubro donde los perfiles de expresión genómica, proteómica y de miRNAs han adquirido

relevancia como herramientas en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares.

### **2.3. Diagnóstico molecular del cáncer de mama.**

Durante la década pasada los principales elementos que se tomaban en cuenta para detectar y clasificar los tumores eran los exámenes físicos, técnicas radiográficas y el análisis histopatológico, sin embargo mediante estrategias que involucran las herramientas de genómica y proteómica se han podido identificar genes y proteínas que son alterados durante la enfermedad y que pueden ser usados para realizar el diagnóstico molecular del cáncer. Estos genes y proteínas característicos de un estadio tumoral se definen como “marcadores moleculares”. Estos pueden ser usados de diversas maneras. Algunos de ellos servirán para determinar la predisposición de una persona al cáncer, otros como herramienta de detección temprana y objeto de estudio para nuevas terapias oncológicas<sup>95</sup>. Por ello, el estudio de los marcadores moleculares es necesario a diversos niveles, lo cual nos permitirá comprender y caracterizar la expresión, interacción y función de estos genes y proteínas en una célula cancerosa o precancerosa.

A la fecha un número considerable de nuevos marcadores moleculares han sido estudiados para determinar su potencial valor predictivo en el pronóstico y respuesta a las terapias y sólo un número pequeño de ellos son utilizados en el análisis de rutina. El interés en encontrar nuevos marcadores se

basa en el hecho de que estas herramientas permitirán realizar tratamientos personalizados que sean menos agresivos con las pacientes y que sean más eficientes reduciendo la mortalidad y la reincidencia.

En el cáncer de mama por ejemplo, el riesgo de recurrencia de un paciente con nódulos linfáticos negativos y un tumor de 1-2 cm es de 20 al 30%. La mayoría de los pacientes en este grupo recibirán terapia sistémica, aunque el 70% de los pacientes no la necesite lo cual tendrá consecuencias para la salud de la paciente. Desafortunadamente, la información histológica no es suficiente para definir de manera precisa el riesgo e impedir el uso de terapia adyuvante sistémica de forma innecesaria. Un diagnóstico adecuado que combine un análisis histológico preciso, combinado con la evaluación de marcadores moleculares pronósticos y un protocolo de terapia sistémica adecuado a la clasificación molecular del tumor, puede contribuir de manera significativa en la sobrevida de la paciente<sup>96</sup>.

Por otra parte, el diagnóstico molecular utiliza el conjunto de los patrones de expresión de los marcadores moleculares, este grupo se conoce como “firma molecular”. Un ejemplo del uso que podrían tener estas firmas moleculares es la reciente creación de la Firma Molecular de Invasividad en Cáncer de mama. Esta signatura se basa en la hipótesis de que el cáncer se origina por células denominadas “células madre cancerosas” y la firma genética de “invasividad” consta de 186 genes que corresponden a la expresión de este tipo de células

<sup>97</sup>. De esta manera se ha demostrado que existen células luminales “normales” que expresan citoqueratinas 5 y 6, las cuales actúan como células madre causantes de la perpetuidad del tumor y que resisten el tratamiento sistémico al tener una expresión génica distinta a la tumoral. Un ejemplo de un miembro de esta firma genética es la proteína BRCA1, la cual bajo circunstancias normales puede regular la proliferación de estas “células madre cancerosas”, sin embargo, la baja regulación de BRCA1 podría estimular la expresión de p63, llevando a un crecimiento anormal de estas células citoqueratinas 5/6 positivas <sup>98</sup>.

Otro ejemplo del uso de marcadores moleculares lo podemos ver en las firmas genéticas comerciales Oncotype Dx <sup>99, 100</sup>, MammaPrint <sup>101</sup>, y Rotterdam <sup>102</sup>, que miden la expresión de un gran número de marcadores moleculares que predicen el resultado clínico, estiman la probabilidad de que el cáncer mamario recurra después de que ha sido quirúrgicamente removido y son usados para decidir qué tipo de terapia adyuvante debe aplicarse después de la cirugía para eliminar células tumorales remanentes, reduciendo así el riesgo de recaída.

Estas pruebas de expresión multigénica emplean distintas tecnologías que incluyen microarreglos de cDNA y RT-PCR convencional y en tiempo real, en distintos tipos de especímenes patológicos tales como tejidos en fresco, fijados en parafina o congelados, etc. El Oncotype Dx es una prueba basada en RT-PCR para cánceres de mama con receptores hormonales positivos, que

evalúa 21 genes (16 relacionados con el cáncer y cinco testigos); categoriza el riesgo de recurrencia distante a 10 años y de beneficio al tamoxifeno y a la quimioterapia y se hace en bloques de parafina <sup>99, 100</sup>. El Mammaprint evalúa 70 genes y el Rotterdam 76 genes en tejidos en fresco, el último de forma independiente al estado de los receptores hormonales <sup>101, 102</sup>.

Por otra parte aunque el perfil molecular es una herramienta poderosa y determinante en la evaluación de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, deben considerarse otros factores de importancia. Por ejemplo, la respuesta al tratamiento y la toxicidad pueden estar influidas por el metabolismo del fármaco y por las vías de reparación inherentes a la actividad del DNA, bajo la influencia del perfil genético del paciente. Al evaluar estos parámetros se tiene el potencial para predecir las reacciones adversas a las drogas y con más acierto las respuestas a los tratamientos. De acuerdo a los datos reportados durante el 2005 por el Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group <sup>96</sup>, las mujeres premenopáusicas con cáncer de mama con ganglios negativos (N0) reciben quimioterapia adyuvante con beneficio de supervivencia de 3% a cinco años, lo que implica que de cada 33 mujeres tratadas con quimioterapia solo se salva una. El empleo de las firmas génicas permitiría revertir este tipo de estadística haciendo más eficiente el empleo de las terapias adyuvantes.

#### 2.4. Perfiles de expresión genómica y proteómica en cáncer de mama.

Durante la década pasada, el uso de microarreglos de cDNA ha sido aplicado exitosamente para definir perfiles de expresión genómica de tumores de cáncer de mama, lo cual ha resultado en una mejor clasificación a nivel molecular de la neoplasia y en la identificación de huellas génicas con potencial valor pronóstico. Los cambios en la expresión de los genes identificados han sido aplicados en la predicción en la respuesta al tratamiento y han permitido mejorar los criterios clínicos para el manejo de las pacientes. Además, los microarreglos de DNA permiten clasificar subtipos de cáncer de mama, que presentan perfiles de expresión génica específicos. Estos reportes muestran que estos marcadores moleculares pueden ser de gran utilidad para mejorar la detección, la clasificación, el diagnóstico temprano, y el pronóstico del cáncer de mama y pueden ser utilizados como nuevos blancos terapéuticos permitiendo mejorar el tratamiento y la sobrevida de las pacientes<sup>95, 97</sup>. Sin embargo, una de las limitaciones del uso de microarreglos es que estos estudios han sido realizados en fragmentos de tumores congelados, lo cual implica que en un estudio *in vivo* se requeriría de un método invasivo para acceder al tumor, por otra parte la escasa accesibilidad al “tejido mamario normal” dificulta la realización de estudios de validación a gran escala.

Por otra parte, los estudios de perfiles de expresión global de proteínas, se están usando cada vez más para inferir las asociaciones moleculares entre numerosos productos génicos implicados en crecimiento, sobrevivencia,

progresión, capacidad de metástasis y resistencia terapéutica en el cáncer. La tecnología de la proteómica ofrece la oportunidad de descubrir marcadores moleculares así como la caracterización de las modificaciones post-traduccionales que estos puedan tener <sup>112</sup>.

## 2.5. Uso de los miRNAs para la clasificación y pronóstico del cáncer

Diversos reportes muestran el potencial valor diagnóstico y pronóstico de los perfiles de expresión de los miRNAs en distintos tipos de cáncer. La existencia de perfiles de expresión únicos de miRNAs en distintos tipos de tumores y sus subtipos histológicos, es fundamental debido en gran medida a la especificidad tisular de los miRNAs, lo cual constituye un complemento útil en la clasificación de los tumores apoyando a los métodos ya conocidos. Mediante análisis de la expresión de miRNAs, Lu J *et al.*, <sup>83</sup>, ha podido clasificar correctamente 12 de 17 carcinomas pobremente diferenciados. En contraste, un microarreglo basado en RNAm sólo pudo clasificar correctamente uno de estos carcinomas. Por otra parte, los miRNAs se pueden utilizar para el pronóstico del cáncer, por ejemplo, la expresión reducida de *let-7* y la alta expresión de miR-155 en cáncer de pulmón humano se asociaron con la baja supervivencia de los pacientes, por lo que estos miRNAs podrían utilizarse para identificar aquellos pacientes que requieran un mayor seguimiento y terapia adyuvante <sup>113</sup>.

Cabe señalar que debido a que los miRNAs son expresados de manera diferencial entre los tejidos normales y cancerosos, la caracterización de los



perfiles de expresión global de los miRNAs puede aplicarse para diferenciar entre las lesiones pre-malignas y malignas en diversos tipos de cáncer. Esto pone en evidencia la utilidad de los miRNAs como marcadores tumorales, pudiendo ser aplicados en la predicción del comportamiento clínico del tumor, la invasión hacia los ganglios linfáticos o la metástasis a distancia así como el riesgo de recaída <sup>25</sup>. En conclusión, los miRNAs son una nueva herramienta molecular que aunada a todas las existentes permitirán el desarrollo y mejoramiento de las nuevas estrategias de terapia molecular específica y personalizada, por ello el valor de realizar estudios en este tema que analicen la expresión de miRNAs en nuestra población.

### 3. Antecedentes particulares del proyecto.

#### 3.1. miRNAs en carcinomas de mama.

A la fecha, se han reportado diversos estudios que identifican miRNAs regulados diferencialmente entre el tumor y el tejido mamario normal, que sugieren su uso potencial como clasificadores de la enfermedad y herramientas de pronóstico en este campo. En su análisis de 76 tumores de mama y 34 especímenes normales, Iorio *et al.*,<sup>82</sup> identificó 29 miRNAs que fueron expresados diferencialmente en el tejido del cáncer de mama en comparación al normal, más un conjunto de 15 miRNAs que podrían discriminar correctamente entre el tumor y el tejido mamario normal. Además, reportó la expresión de miRNAs correlacionados con características patológicas tales como la expresión del receptor de estrógenos y progesterona (miR-30), el estadio tumoral (miR-213 y miR-203), y la expresión diferencial de varias isoformas de let-7, que asoció con la expresión del receptor de progesterona (let-7c) y metástasis en los ganglios linfáticos (let-7f-1, let-7a-3, let-7a-2). Posteriormente, Mattie *et al.*<sup>114</sup> identificó conjuntos de miRNAs asociados con el status de expresión de RE, RP y Her2. De manera significativa, se registró coincidencia entre los miRNAs identificados en ambos estudios. En otros estudios realizados por Lowery *et al.*,<sup>115</sup> se encontró que en cáncer de mama precoz los niveles de expresión de miR-195 y miR-154 correlacionan negativamente con la presencia del RE. Blenkiron *et al.*, en el 2007<sup>116</sup>, realizó el análisis de la expresión de miRNA en 93 tumores primarios de mama humanos, encontrando que existen miRNAs expresados diferencialmente entre

tumores de distintos subtipos y miRNAs que individualmente están relacionados con factores clínico-patológicos, además de encontrar que la expresión de DICER1 y AGO2 se correlaciona con el subtipo de tumor y puede explicar algunos de los cambios observados en la expresión de miRNAs. En otra publicación reciente Tavazoie *et al.*,<sup>117</sup> reporta miRNAs específicos que son capaces de suprimir el crecimiento tumoral en cáncer de mama, demostrando en un modelo de ratón que la restauración de la expresión de miR-126 y miR-335 reducen el crecimiento tumoral. Finalmente, Davoren *et al.*, 2008<sup>118</sup> propone controles endógenos fiables para el análisis de miRNAs por qRT-PCR en el tejido mamario humano, validándolos posteriormente en biopsias mamarias. Sin lugar a duda estos antecedentes señalan a los miRNAs como una valiosa herramienta en la lucha contra el cáncer de mama, no sólo por su valor como marcadores moleculares sino por su importante participación en los eventos celulares como la migración e invasión celular, procesos que llevan a la metástasis tumoral; proceso final del cáncer que lleva a las pacientes a sucumbir ante la enfermedad.

### **3.2. Metastamirs: miRNAs asociados a migración, invasión y metástasis.**

La metástasis es el proceso celular por el cual las células cancerosas migran del tumor primario hacia otras partes del cuerpo. Para que las células tumorales puedan formar un tumor secundario, deben adquirir alteraciones genéticas que favorezcan su diseminación. La transformación epitelial mesenquimal (TEM), es un prerrequisito para la metástasis en el cáncer y una

de sus consecuencias es la pérdida de proteínas de adhesión celular que funcionan como supresores de la migración y la metástasis. Igualmente, las células metastásicas deben cumplir tres requisitos, i) ser invasivas (romper la lámina basal y la matriz extracelular), ii) poder intravasarse (atravesar los vasos sanguíneos) y iii) poder extravasarse (salir fuera de los vasos sanguíneos), además de poder sobrevivir en un nuevo ambiente <sup>8, 17</sup>. Estos cambios están regulados genéticamente y algunos miRNAs han sido relacionados con la adquisición de estas características, de tal manera que los miRNAs que participan en el proceso metastásico han sido denominados recientemente como metastamirs <sup>119</sup>.

El análisis de los miRNAs implicados en los procesos celulares que llevan a la metástasis como la migración, invasión y la transición epitelial mesenquimal apoyará el entendimiento de este proceso sirviendo además como marcadores biológicos de esta etapa y posiblemente blancos terapéuticos específicos por lo que su estudio es fundamental. Entre estos miRNAs que han sido relacionados al proceso metastásico destacan los siguientes:

### **3.2.1. El miR-155 es sobreexpresado en cáncer de mama.**

La asociación entre la expresión de los miRNAs y el cáncer de mama fue más que evidente a través de los estudios de Iorio *et al.*, 2005 <sup>82</sup>, quien como se ha mencionado antes, empleando microarreglos identificó 29 miRNAs que fueron expresados de manera diferencial en cáncer de mama en comparación

con el tejido normal de mama. Entre estos 29 miRNAs, la diferencia más significativa se observó en miR-125b, miR-145, miR-21 y miR-155. Respecto a éste último, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) induce la expresión del miR-155. El knockdown de miR-155 suprime la TEM inducida por TGF- $\beta$ , y la disolución de las uniones estrechas celulares, así como la migración y la invasión celular. Por el contrario, la expresión ectópica de miR-155 reduce los niveles de la proteína RhoA y provoca la disrupción de las uniones estrechas celulares, lo que señala su importante participación en el proceso metastásico.

### **3.2.2. El miR-21 es sobreexpresado en cáncer.**

El miR-21 se sobreexpresa en líneas celulares metastásicas, así como en cáncer de mama, tumores de glioma y cáncer colorectal, gástrico, hepatocarcinoma, páncreas, pulmón, leucemia y próstata <sup>120</sup>. Mir-21 es frecuentemente sobreexpresado en cáncer de mama y promueve el crecimiento celular mediante la inhibición de los genes supresores de tumor tropomiosina-1 (TPM1) y el de muerte celular programada 4 (PDCD4) <sup>121</sup>. De manera importante, la expresión de miR-21 correlaciona con el grado tumoral y la capacidad invasiva hacia los nódulos linfáticos en cáncer de mama, así como con el aumento en la expresión de proteínas como Her2 y metaloproteinasas de matriz extracelular como MMP2 y MMP3 las cuales participan en el proceso metastásico <sup>122</sup>.

### 3.2.3. El miR-205 es comúnmente reprimido en cáncer.

El miR-205 ha adquirido recientemente gran relevancia clínica por su participación en los procesos de invasión celular. miR-205 se encuentra expresado en tejidos mamarios normales y la línea celular no metastásica MCF-10A. Por el contrario, miR-205 se expresa a muy bajos niveles o está ausente en diversos tumores. La expresión ectópica de este miRNA en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231 es capaz de reducir la proliferación, suprimir la invasión y la metástasis *in vivo*. miR-205 suprime la expresión de Erb3 (Her3)<sup>123</sup>, altamente expresado en cáncer de mama y también a la proteína VEGF-A que participa en los procesos angiogénicos, lo que lo convierte a miR-205 en un miRNA con un gran potencial terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama. Como otros blancos putativos de este miRNA se encuentran E2F1, E2F5 y ZEB2, aunque estos últimos no se han validado<sup>124</sup>.

### 3.2.4. La familia de miR-200 se asocia a la transición epitelial mesenquimal.

La TEM es un prerrequisito para la metástasis en el cáncer, y una de las consecuencias de la TEM es la pérdida de la E-caderina, una proteína de adhesión celular que parece funcionar como supresor de la migración y la metástasis y que es regulada por el miR-200. Así mismo, la familia de factores de transcripción ZEB funciona como un mediador del proceso TEM y se encuentra altamente expresada en células mesenquimales invasivas, en este contexto, miR-200 identificado en líneas celulares de pulmón y mama, inhibe la

expresión de los factores ZEB, lo que hace a miR-200 y a sus blancos atractivos para la terapia contra el cáncer <sup>125</sup>.

### 3.2.5. La familia de let-7 actúa como supresor tumoral.

Algunos miRNAs han sido implicados como supresores de genes de tumores. De forma general, la familia de miRNAs let-7 regula la muerte celular en células humanas cancerosas. Por ejemplo, *let-7* reduce su expresión en los carcinomas de pulmón. En tejidos pulmonares normales *let-7* regula negativamente la expresión del proto-oncogen RAS <sup>126</sup>. Otros blancos celulares de let-7 son los reguladores del ciclo celular tales como CDC25A y CDK6, c-myc y genes embriogénicos como HMGA2, Mlin-41 y IMP-1. La pérdida de *let-7* en cáncer resulta en una desdiferenciación celular y si esta se da durante el desarrollo embriogénico resulta en una reversión del proceso. Así mismo, se ha demostrado que *let-7* mantiene el linaje de las células madre, existiendo una progresión TEM cuando se pierde la expresión de *let-7* <sup>127</sup>. En cáncer de mama se ha demostrado que *let-7* regula la regeneración y la proliferación en los tumores <sup>307</sup>.

### 3.2.6. El miR-10b es un marcador de metástasis.

Poco tiempo después, la participación de los miRNAs en la progresión a metástasis fue reportada por Ma *et al*, 2007 <sup>128</sup>, en la revista *Nature* demostrando que el miR-10b es requerido para la invasión y la metástasis del cáncer de mama, pero no para su viabilidad. Estudios *in vivo* indican que miR-

10b no afecta el crecimiento primario del tumor pero las células que sobre-expresan el miRNA presentan una elevada angiogénesis evidenciada al evaluar la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y MECA-32 una proteína marcadora de células endoteliales. El mecanismo propuesto para favorecer la invasión y la metástasis es mediante la reducción de su blanco, el factor de transcripción HOXD10, que promueve el mantenimiento del fenotipo diferenciado en células epiteliales. Finalmente, se demostró que RhoC, una proteína G involucrada en la metástasis es reprimida por HOXD10 y se expresa de forma exacerbada en respuesta a la restauración de miR-b10.

### 3.2.7. Los miR-126, miR-206 y miR-335 son supresores de tumor.

Tavazoie *et al.*, 2008 <sup>117</sup> revelaron que miR-335, miR-126 y miR-206 son supresores de tumor al comparar la expresión de miRNAs en nódulos metastásicos contra la expresión en células de mama cancerosas no metastásicas. Estos miRNAs fueron expresados a la baja en los nódulos metastásicos. En células metastásicas en las cuales se restauró la expresión de miR-335, se disminuyó la capacidad invasiva *in vitro* y el potencial metastásico *in vivo*, además se encontró que la expresión de seis proteínas fue suprimida por miR-335. Entre estas se encuentran los factores de transcripción SOX4 y TNC (factor de transcripción para tenascina C, un componente de la matriz extracelular) lo que indica que estas proteínas son efectores críticos de la metástasis y que son activados por la pérdida de miR-335. Por otra parte, los autores encontraron que la restauración de la expresión de miR-126 disminuye



significativamente el número de nódulos metastásicos *in vivo*. Este mismo miRNA, también regula la invasión, migración y adhesión de células no pequeñas cancerígenas de pulmón <sup>129</sup>.

### **3.2.8. El miR-373 es sobreexpresado en cáncer.**

Estudios posteriores demuestran que al igual que miR-10b, el miR-373 no afecta la proliferación pero si la migración y el fenotipo invasivo en la línea celular MCF-7, llegando incluso a favorecer la formación de nódulos. El mecanismo propuesto es a través de CD44, el cual es blanco de este miRNA. Esto se observó en 11 muestras de carcinoma mamario humano encontrándose que el miR-373 se encuentra sobreexpresado en cáncer, en particular en tumores que presentan metástasis en los nódulos linfáticos, a la vez que existe una correlación inversa con la expresión de CD44 <sup>130</sup>.

### **3.2.9. El miR-31 es un miRNA anti-metastásico.**

Otro miRNA que tiene una función pleiotrópica en cáncer de mama es miR-31. Este fue descubierto como un miRNA antimetastásico ausente en las células tumorales de cáncer de mama. En células no metastásicas como las MCF-7, la expresión del miR-31 no tienen efecto en el crecimiento primario del tumor ni sobre la proliferación, pero en la línea celular MDA-MB231 el miR-31 reprime genes relacionados con metástasis. Estos datos reflejan que la función de un miRNA puede ser dependiente del contexto celular o bien, que un miRNA requiere de otros miRNAs actuando en conjunto para llevar a cabo su efecto,

sin embargo este tipo de supuestos aún son apenas comprendidos. Entre los genes blanco de este miRNA se encuentra la metalopeptidasa de matriz 16 (MMP16), la radixina (RDX), frizzled3 (Fzd3), integrina  $\alpha 5$  (ITGA5) y RhoA, genes que juegan un papel importante en la metástasis <sup>131</sup>.

### 3.2.10 . El miR-146a/b como miRNA antimetastásico.

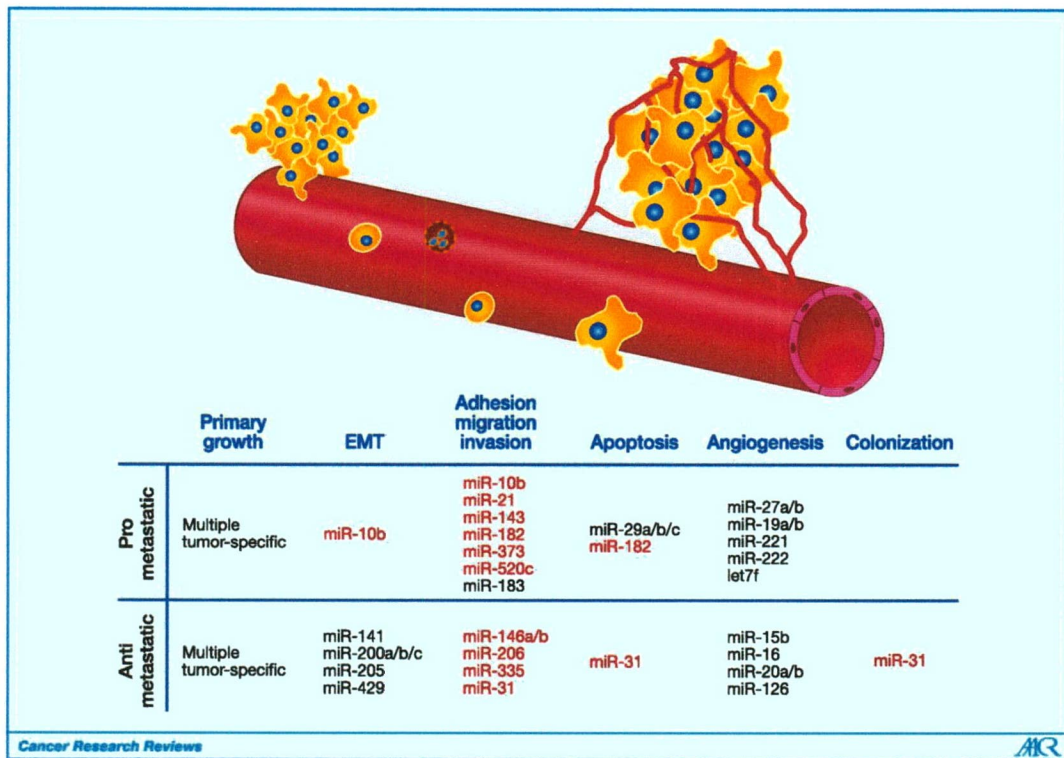
Se ha demostrado que miR-146 participa en el proceso inflamatorio a través de la regulación del factor nuclear  $\text{NB}_{\kappa\beta}$  <sup>132</sup>. A pesar de miR-146 a y b están codificados en diferentes cromosomas, su secuencia de difiere en sólo dos nucleótidos en la región 3'. Así se han predicho sus RNAm blanco y estos se superponen de manera significativa. De hecho, tanto miR-146a y b inhiben la invasión y la migración de las células de cáncer de mama *in vivo*, mostrando que ambos miR-146 suprimen la metástasis <sup>133</sup>. De manera notable, la expresión de miR-146a inhibe la migración y la invasión en glioma <sup>134</sup> y células pancreáticas <sup>135</sup>.

Como se puede apreciar, diversos miRNAs han sido relacionados con la invasión y metástasis de cáncer mama ya que han sido encontrados alterados en líneas celulares metastásicas y además presentan cambios notables en su expresión en distintos tipos de cáncer altamente invasivos. Así mismo, sus blancos potenciales y validados indican que participan en este proceso. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un estudio en cáncer de mama que evidencie la modulación de estos miRNAs en diversas etapas de la

progresión tumoral; a excepción del miR-21 del cual ya han sido reportados los cambios en su expresión en muestras tumores de mama en distintas etapas, los cuales correlacionan con el grado de invasividad y sobrevivencia después de la operación de recisión tumoral <sup>122</sup>. La figura 8, ejemplifica algunos de los pasos del proceso invasivo en los cuales los metastamirs podrían participar.

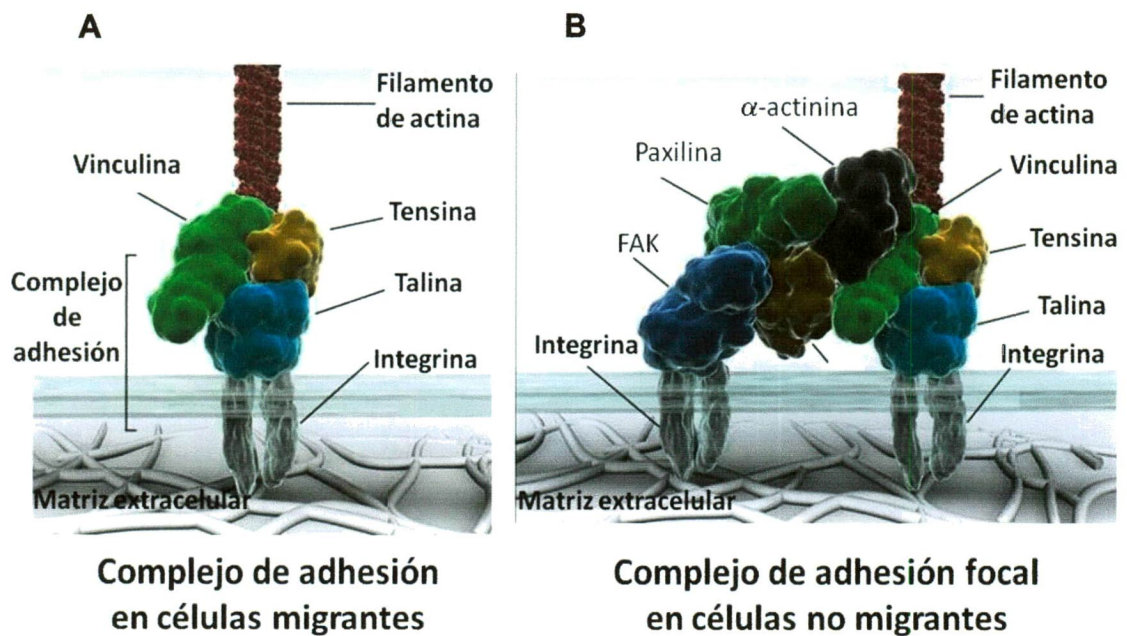
### **3.3 Los complejos de adhesión focal y su relación con la migración e invasión.**

La invasión y migración celular son procesos biológicos clave en la oncogénesis ya que la metástasis del cáncer depende de ellos. Los eventos que participan en estos procesos, van desde la transcripción de proteínas metaloproteinasas hasta la formación de estructuras moleculares como el caso de los complejos de adhesión focal. Estos últimos son conjuntos macromoleculares compuestos por más de 50 proteínas, a través de los cuales se transmiten tanto la fuerza mecánica y señales reguladoras que se requieren durante la migración e invasión celular. Descrito de manera más general, la adhesión focal se puede considerar como el complejo de macromoléculas que adhieren a la célula a la matriz extracelular <sup>271</sup>. Estos complejos pueden estar formados por más de 50 proteínas distintas identificadas hasta el 2001. Entre estas proteínas las integrinas y las proteínas adaptadoras tales como talina,  $\alpha$ -actinina, filamina, vinculina, paxilina y proteínas de señalización intracelular, tales como la cinasa de adhesión focal ( FAK ), son los componente básicos de este complejo <sup>272</sup>.



**Figura 8. Participación de los miRNAs en el proceso de la metástasis.** Se señala la función que tiene cada miRNA (pro o anti-metástasis) en cada uno de los pasos de la cascada metastásica. En rojo se indican los miRNAs que han sido caracterizados funcionalmente *in vivo*. EMT (Transición epitelial mesenquimal). (Tomado de Hurst DR <sup>119</sup>).

La conexión entre las adhesiones focales y las proteínas de la matriz extracelular esta mediada a través de la proteína integrina. Estas últimas se unen a proteínas extracelulares a través de secuencias cortas de aminoácidos, tales como las secuencias motivo RGD, DGEA y GFOGER que se encuentran en las proteínas de matriz extracelular como el colágeno. Las integrinas forman heterodímeros a partir de una subunidad beta y una alfa. Existen diversas familias de estas proteínas las cuales difieren en su especificidad y afinidad para las diferentes proteínas de la matriz extracelular. Dentro de la célula, el dominio intracelular de la integrina se une al citoesqueleto a través de las proteínas adaptadoras Talina, Actinina, Filamina y Vinculina <sup>309, 310</sup>. Las adhesiones focales suelen variar en sus componentes de acuerdo al estado de movilidad de la célula, sí la célula esta en movimiento la mayor parte de la adhesiones focales están en recambio y son estructuras más pequeñas y con menos proteínas asociadas llamadas "complejos focales". La célula en reposo o inmóvil presenta un número amplio de adhesiones focales que no presentan recambio y con una estructura compuesta de una mayor número de proteínas (figura 9). Cabe señalar que existen diversos tipos de unión/comunicación de la célula con la matriz extracelular como los desmosomas y hemidesmosomas, así como las uniones estrechas, entre otras; que aunque no son descritas aquí, sus componentes moleculares suelen ser similares sin embargo las estructuras moleculares convencionalmente asociadas a la motilidad son las adhesiones focales.



**Figura 9. Estructura básica de los complejos de adhesión celular.** El esquema muestra los componentes básicos de la estructura del complejo de adhesión focal y las diferencias existente entre el complejo de adhesión, presente en las células migratorias y el complejo de adhesión focal, que funciona como molécula de anclaje en las células móviles y se encuentra presente alrededor de toda la célula en aquellas en estado de reposo. (A) Complejo de adhesión. (B) Complejo de adhesión focal. Modificada del Cell Migration Lab <sup>314</sup>.

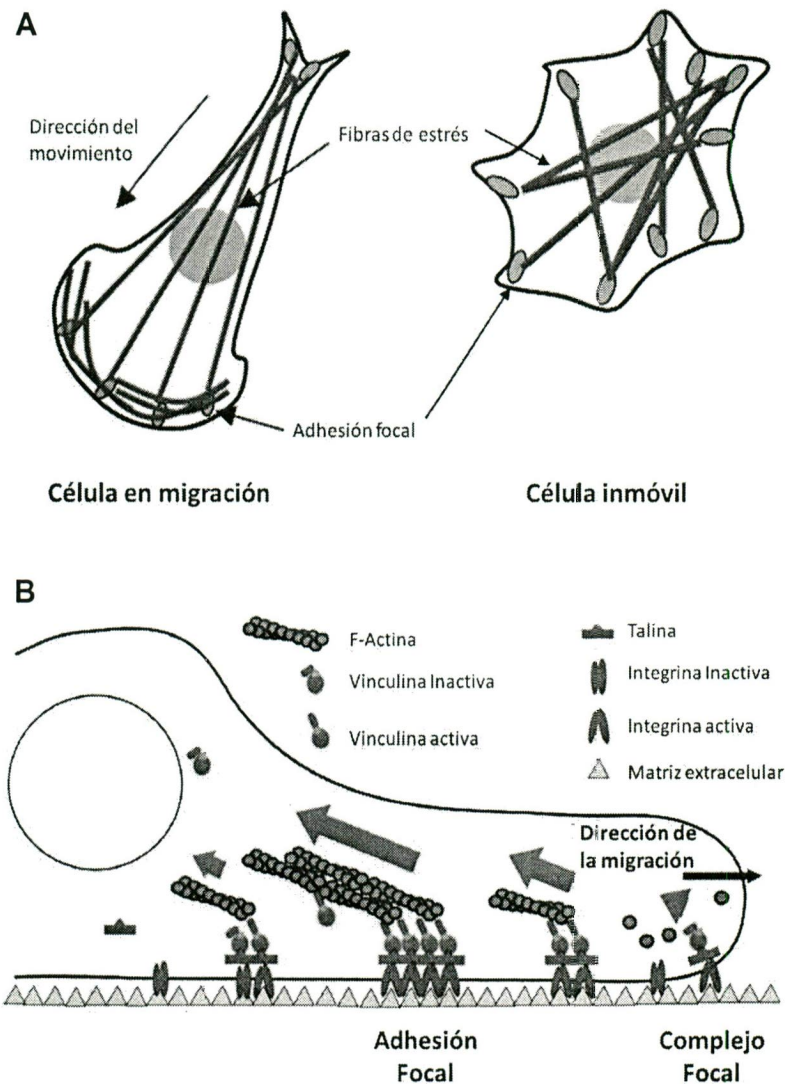
### 3.3.1. Dinámica de la adhesión focal en células migrantes.

Las proteínas que forman el complejo de adhesión focal están en un estado de recambio constante; se asocian y disocian entre ellas de manera continua a medida que se transmite la señal que indica a la célula que debe tener motilidad hacia algún punto específico. Esta señal puede estar siendo transducida al interior de la célula gracias a proteínas como FAK, por lo cual, además del anclaje de la célula, los complejos de adhesión focal informan a ésta acerca de la condición de nutrientes en la matriz extracelular y por lo tanto son capaces de redirigir la motilidad hacia los microambientes más favorables para la célula. El ensamblado dinámico y desmontaje de las adhesiones focales juega un papel central en la migración celular. En las células inmóviles, las adhesiones focales son bastante estables y no varían su composición, mientras que en células migrantes o invasivas disminuye su estabilidad. Esto se debe a que en las células móviles, las adhesiones focales están siendo constantemente ensambladas y disociadas conforme la célula establece nuevos contactos en el frente de avance del lamelipodio (figura 10A)<sup>308, 309, 310</sup>.

Sin embargo el cambio dinámico en los complejos de adhesión focal va más allá del simple ensamble/desensamble. Durante la migración celular, tanto la composición como la morfología de la adhesión focal varían drásticamente. Al inicio de la migración pequeñas adhesiones focales llamadas “complejos focales” se forman en el frente de avance de los lamelipodios celulares: consisten de integrina, talina y paxilina. Algunos de estos complejos se

desmontan conforme el lamelipodio se contrae. Sin embargo, otros maduran en adhesiones focales más grandes y estables, incrementando la cantidad de vinculina y reclutando más proteínas tales como Zyxin, una proteína adaptadora relacionada a paxilina <sup>310</sup>. Una vez consolidada esta estructura, la adhesión focal permanece estacionaria con respecto a la matriz extracelular y la célula utiliza esto como un ancla con la cual se empuja o tira de sí misma a través de la matriz extracelular. A medida que la célula avanza, la adhesión focal estable es regelada a la parte posterior de la célula lo que se denomina “borde de salida” <sup>311</sup>. Llegando a este punto el complejo de adhesión focal debe ser desensamblado por un mecanismo dependiente de Calpaina, una proteasa dependiente de calcio que tiene como sustrato algunas proteínas de andamiaje de la adhesión focal (figura 10B) <sup>312</sup>. La dinámica de recambio en las adhesiones focales ha sido objeto de estudios donde se ha demostrado que la inhibición del recambio de sus componentes tiene como consecuencia la inhibición de la migración. Esto fue demostrado con el inhibidor de la invasión celular tumoral Strongylophorine-26 el cual, a través de un mecanismo Rho dependiente reduce la formación de lamelipodios, inmovilizando a las células con la consecuente formación de complejos de adhesión focal en la periferia de la célula <sup>313</sup>. Esto demuestra que las moléculas de los complejos de adhesión focal son un candidato muy factible para utilizarse como blanco terapéutico en el tratamiento contra el cáncer ya que la movilidad y la migración celular dependen de la dinámica funcional de este complejo.





**Figura 10.- Dinámica de las moléculas de adhesión focal durante la migración.** La figura muestra los cambios en la localización así como el ensamble/desensamble de las adhesiones focales. (A) Localización de los complejos de adhesión focal en células en migración (izquierda) e inmóviles (derecha) Modificado de McHardy, 2005 <sup>313</sup>. (B) Dinámica del ensamble y desensamble de los complejos de adhesión focal. Se muestra como al inicio del lamelipodio se forman los complejos focales, estructuras más pequeñas en comparación con los complejos de adhesión focal los cuales reclutan más proteínas y sirven de anclaje en células fijas y móviles, así como su eventual degradación.

#### 4. Importancia de continuar el estudio del tema.

Los perfiles de expresión génica de miRNAs son elementos clave en el entendimiento de la biología tumoral y han demostrado un gran potencial clínico y científico en la búsqueda de marcadores moleculares. A través de ellos se ha demostrado que las interacciones moleculares entre miRNAs y sus respectivos blancos favorecen la naturaleza heterogénea del cáncer de mama y como se ha señalado anteriormente, estas herramientas permiten realizar la distinción entre un tejido normal y uno tumoral, además de poder subclasificar los distintos tipos tumorales. Hasta el momento, la mayoría de los perfiles globales de miRNAs que se han reportado en carcinomas de mama han sido evaluados en población caucásica, bajo distintas metodologías pero que han demostrado una congruencia en los resultados obtenidos<sup>82, 114, 116</sup>. Es por esta razón, que el análisis de los perfiles de expresión génica de miRNAs en biopsias de mama de pacientes mexicanas, enriquecerá el conocimiento que se tiene en este rubro y podrá proveer información de la posible variación de expresión génica o alteraciones particulares que afectan a las mujeres de nuestro país.

En México, los estudios encaminados a definir los perfiles de expresión de miRNAs y su posible aplicación clínica en cáncer de mama de mujeres mexicanas son escasos. Los estudios pioneros en México han sido realizados por el grupo del Dr. Alfredo Hidalgo y la bióloga Sandra Lorena Romero Córdoba, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, los cuales analizaron un grupo heterogéneo de tumores de mama encontrando que la expresión de

122 miRNAs fue alterada en las muestras analizadas <sup>136</sup>. Los datos aportados por nuestro estudio se suman a este esfuerzo encaminado a comprender este padecimiento y sus particularidades en nuestra población.

Por otra parte, como se ha señalado anteriormente, los miRNAs representan una herramienta que permitirá dirigir terapias de tratamiento, detección, seguimiento y predisposición. Además, en el sentido biológico los miRNAs son moléculas de fácil detección y sumamente estables a comparación del RNAm y las proteínas, pudiendo ser detectados incluso en tejidos embebidos en parafina. La detección de estas moléculas en el plasma y suero humano realzan su potencial valor como marcadores tumorales.

Cabe destacar que algunos de estos marcadores moleculares han sido estudiados funcionalmente, demostrando su participación en la oncogénesis y progresión tumoral, donde regulan procesos como la transición epitelial mesenquimal, la migración y la invasión de las células tumorales. Con la finalidad de evidenciar la posible participación de miRNAs específicos que aun no han sido caracterizados funcionalmente y que podrían participar en el proceso tumoral, determinamos los perfiles de expresión global de 667 miRNAs en biopsias de tumores de mama en población mexicana.

## II. OBJETIVOS.

### Objetivo general.

Determinar los perfiles de expresión de microRNAs en cáncer de mama de pacientes mexicanas y realizar el análisis funcional del miR-944 y miR-18b en la adhesión focal y migración celular.

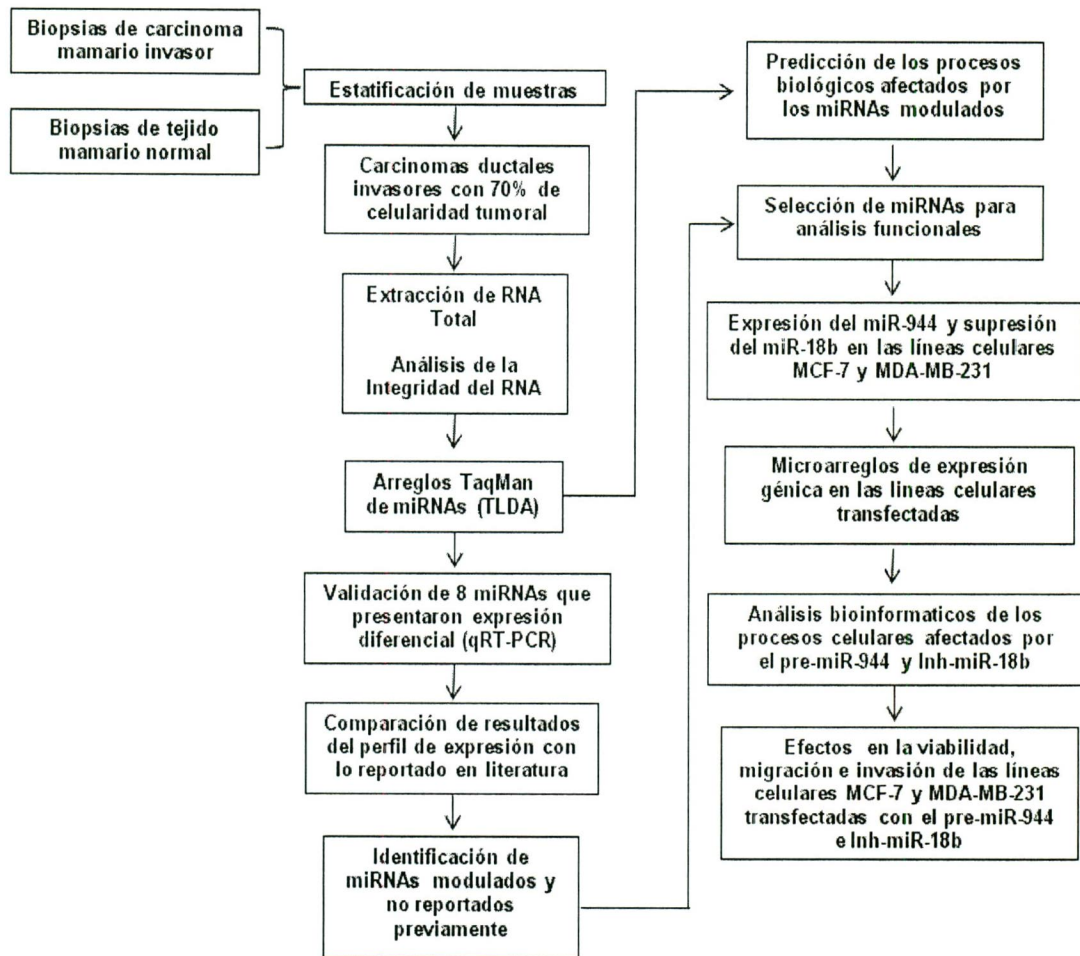
### Objetivos particulares.

1. Obtener los perfiles de expresión global de 667 miRNAs en biopsias de tumores mamarios y de tejido mamario normal.
2. Validar los perfiles de expresión de los miRNAs mediante qRT-PCR en tiempo real para ocho miRNAs expresados diferencialmente entre los tumores y el tejido mamario normal.
3. Predecir los mRNAs blanco de los miRNA modulados y las rutas biológicas en los cuales podrían participar las proteínas predichas.
4. Realizar el estudio funcional del miR-944 y miR-18b en la adhesión focal y migración celular.

### III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

#### **Estrategia experimental general.**

El diseño del presente proyecto comenzó con la recolección de las biopsias de tejido mamario normal y tumoral que conforman nuestro banco de tejidos, así como con la recolección de datos clínicos de las pacientes. Posteriormente las biopsias fueron estratificadas seleccionando las muestras con histopatología ductal invasora y con una celularidad adecuada para la extracción del RNA. Las muestras con mejor integridad fueron utilizadas en el estudio. El perfil de expresión de miRNAs de muestras tumorales se obtuvo mediante los arreglos TLDA que permiten cuantificar 667 miRNAs mediante el uso de sondas TaqMan. Los resultados fueron validados mediante sondas específicas para ocho miRNAs y los resultados del perfil comparados con lo reportado en la bibliografía. Esto permitió determinar cuales miRNAs no han sido reportados en cáncer de mama y considerando las predicciones de blancos y rutas de señalización moduladas se eligió el miR-944 (reprimido) y el miR-18b (sobrexpresado) para su estudio funcional. Posterior a la transfección del pre-miR-944 y del Inh-miR-18b en las células MDA-MB-231 y MCF-7, el RNAm de las células fue evaluado mediante microarreglos de expresión génica y los resultados analizados con el software DAVID Ontology para determinar los procesos biológicos afectados por estos miRNAs. Posteriormente la viabilidad, la migración y la invasión celular de las células transfectadas fueron evaluadas para determinar la participación del miR-944 y miR-18b en estos procesos (Figura 11).



**Figura 11. Estrategia experimental.** Diagrama de flujo que simplifica la estrategia metodológica que se llevó a cabo durante el desarrollo del proyecto. La ruta comienza con la obtención de las biopsias de tejido mamario tumoral y normal que fueron procesadas para la obtención de los perfiles de expresión como se muestra en el diagrama. Los análisis posteriores fueron considerados para la elección de los miRNAs que fueron estudiados funcionalmente.

#### **IV. METODOLOGÍA.**

##### **1. Obtención de biopsias de tejido mamario tumoral y tejido mamario normal.**

Las biopsias de cáncer de mama y de tejido mamario normal que han sido usadas en este estudio, fueron donadas por el Instituto de Enfermedades de la Mama - FUCAM, a través de un convenio de cooperación establecido entre el FUCAM y la UACM. Las biopsias tumorales fueron obtenidas de mujeres que llegaron voluntariamente a este centro y que de acuerdo a los procedimientos de ética e higiene del FUCAM fueron sometidas a cirugía. Las biopsias de tejido mamario normal fueron obtenidas de estas mismas mujeres siguiendo el acuerdo de consentimiento por escrito y firmado por las pacientes. Estas fueron tomadas a 5 cm del tumor lo cual garantiza que no hay contaminación de tejido maligno.

Por otra parte, las muestras tumorales se fragmentaron en porciones de al menos 0.5 cm equivalentes a 2 mg de tejido. Este fragmento tumoral y el tejido mamario normal fueron embebidos en un medio criosolidificable (Tissue-Tek) en criotubos de plástico y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido que permitió su congelación rápida. Finalmente, los criotubos fueron almacenados a -80°C para su preservación hasta el momento de su análisis. Las biopsias se etiquetaron con un número que garantiza la confidencialidad de la paciente. Con este procedimiento se logró establecer un banco con 196 muestras.

## **2. Estratificación y selección de muestras.**

Como criterios de exclusión el banco de muestras sólo se conforma con pacientes que no tuvieron tratamiento previo a la operación (quimioterapia, radioterapia o tratamiento hormonal) que pudieran inducir cambios en la expresión de miRNAs. De manera adicional, pacientes con alguna otra enfermedad degenerativa o que pudiera alterar la expresión de miRNAs o que pusiera en duda su historial clínico como en los casos de hipertensión arterial, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica, insuficiencia renal y trastornos psiquiátricos al momento del diagnóstico fueron excluidas. De igual manera, pacientes con fuerte historia de cáncer de mama familiar, con carcinoma ductal invasivo bilateral, y con resultados anatomopatológicos de cáncer no confirmados fueron también excluidas, esto con el fin de asegurar de que las paciente solo presenten cáncer esporádico y de que el diagnóstico sea preciso. Una vez realizada la operación se tomó una impronta del tumor y el patólogo evaluó si la biopsia era adecuada para el estudio considerándose óptima si presentaba al menos un 70% de células malignas. Solamente este tipo de muestras fue considerado para proceder a la extracción del RNA.

Además, para la realización de este estudio, se han recopilado los datos clínicos y patológicos de las pacientes y han sido sintetizados en una base de datos que incluye los siguientes parámetros: Edad, etapa clínica, tamaño tumoral, etapa patológica, variedad histopatológica, SBR, expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y Her2, así como la clasificación acorde



a la expresión de estos últimos. Se incluyen además los antecedentes familiares y datos personales.

### **3. Lisis y extracción de RNA total de biopsias mamarias.**

Para obtener el RNA total que fue utilizado en este estudio las muestras fueron lisadas con 1 ml de trizol por cada muestra de tejido, utilizando un homogenizador de tejidos (TissueRuptor, Quigen). El procedimiento fue realizado en hielo, con 3-5 impulsos de 10 seg a máxima velocidad y descansos de 20 seg, evitando calentar la muestra. El lisado fue recuperado en un microtubo e incubado durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de disociar los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se añadieron 0.3 ml de cloroformo por ml de trizol y se mezclaron los reactivos por inversión durante 15 seg. El microtubo se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior incolora. Se recuperaron 400 µl de la fase superior la cual contiene el RNA y se añadieron 200 µl de isopropanol para precipitar durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4°C a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con etanol al 100%. Posteriormente, se realizó otra centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5 min. El RNA fue finalmente resuspendido en un volumen de 20 µl de agua dpc o libre de nucleasas.

#### 4. Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA total purificado.

La cuantificación del RNA total fue realizada en un equipo nanodrop. Las moléculas de RNA tienen una relación de densidad óptica 260/280 mayor de 1.8 lo cual indica que el RNA se encuentra limpio de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del RNA. Las muestras seleccionadas cumplieron con este criterio. Así mismo, la integridad del RNA fue evaluada mediante el sistema de electroforesis capilar Bioanalyzer de Applied Biosystems, el cual asigna un número entre 1 y 10 denominado RIN (RNA Integrity Number), este número se calcula con base a un algoritmo que calcula la relación entre la fracción ribosomal 28S y 18S siendo 10 el valor de mayor calidad asignado. Solamente las muestras con un RIN superior a 5.5 fueron seleccionadas para ser analizadas mediante TLDA.

#### 5. Transcripción reversa (RT) de miRNAs.

Para obtener los perfiles realizamos RT-PCRs de miRNAs de las biopsias mamarias mediante el uso del pool de primers stem-loop RT Megaplex (Applied Biosystems), que permiten la conversión a cDNA de cientos de miRNAs maduros en una sola reacción. De manera inicial, 3  $\mu$ l (60-100 ng/ $\mu$ l) de RNA total, son sumados a la mezcla que contiene: 0.80  $\mu$ l de primers RT Megaplex 10X; 0.20  $\mu$ l de dNTPs con dTTP (100mM); 1.5  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ $\mu$ l); 0.80  $\mu$ l de buffer RT 10X; 0.90  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0.10  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (20 U/ $\mu$ l) y 0.20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre

de RNasa, que en total suman 7.5  $\mu$ l por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), programando 40 ciclos de tres temperaturas a 16°C por 2 min; 42°C por 1 min; 50°C por 1 s; seguido de un paso de 85°C por 5 min y un paso final a 4°C $\infty$ .

## **6. Preamplificación del producto de RT.**

Con el fin de detectar miRNAs que presenten un nivel muy bajo de expresión, así como de minimizar la cantidad de muestra requerida, se realizó una preamplificación previa a la detección por PCR en tiempo real. Esta consiste en una mezcla de reacción que contiene: 12.5  $\mu$ l de la master mix TaqMan PreAmp (2X); 2.5  $\mu$ l de los primers Megaplex PreAmp (10X); 7.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2.5  $\mu$ l del producto de reacción, dando un volumen final de 25  $\mu$ l por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700, programando tres pasos a 95°C por 10 min; 55°C por 2 min; 72°C por 2 min; seguido de 12 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 4 min, posteriormente continua un paso de 99.9°C por 10 min y finalmente un paso de 4°C. El producto de la preamplificación fue diluido con 75  $\mu$ l de TE pH 8.0 y almacenado a -20°C o analizado mediante PCR en tiempo real.

## 7. Perfiles de expresión de miRNAs.

Se analizó la expresión de miRNAs mediante el arreglo TaqMan MicroRNA Array v2.0 A+B de baja densidad, (TLDA, TaqMan Low Density Array) el cual contiene dos placas con sondas TaqMan conteniendo 667 miRNAs humanos más ocho controles internos, lo que permitió evaluar de manera confiable la expresión conjunta de los miRNAs en un solo experimento. Las sondas corresponden a secuencias de los miRNAs reportados en la base de datos mirBASE v10.0 de humano (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Para esto, 9  $\mu$ l del producto diluido de la preamplificación son mezclados con 441  $\mu$ l de agua libre de RNAsas más 450  $\mu$ l del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X). El análisis se realizó en un equipo 7900 FAST de Applied Biosystems, el cual posee un bloque especial de 386 pozos para PCR en tiempo real. La reacción se llevo a cabo programando un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Con este procedimiento se analizaron un total de 29 muestras. 9 muestras de tejido tumoral que fueron comparadas con un set de 20 muestras de tejido normal organizadas en dos conjuntos equimolares (pool) de 5 y 10 muestras más 5 muestras independientes. La variabilidad, confiabilidad y reproducibilidad de estos ensayos fue validada previamente en la tesis de la Biol. Sandra Lorena Romero Córdoba <sup>137</sup>, quien además verificó la correlación entre replicas técnicas y realizó un análisis de componentes principales comprobando que los perfiles obtenidos permiten diferenciar

claramente la expresión de miRNAs entre una muestra tumoral y una de tejido normal.

### **8. Análisis del perfil de expresión.**

Los resultados de la reacción de PCR fueron capturados con el software S.D.S 2.4, lo que nos permitió tener los valores crudos de CT (Ciclo Treshold) de cada detector contenido en el microarreglo, con el método de lectura RQ (Relative Quantification), ajustando los parámetros con una línea de corte manual de 0.2 y una línea basal automática, acorde a las instrucciones del fabricante. Estos datos fueron procesados en los programas RQ Manager 1.2.1 (para realizar la conversión de datos en un archivo de texto) y DataAssist 2.0 ambos de Applied Biosystems. Este último nos permitió generar la lista de miRNAs con expresión diferencial utilizando el método comparativo de ct ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ). Se consideró como calibrador la expresión resultante de 20 tejidos mamarios normales y como normalizador la expresión de los RNAs pequeños nucleolares RNU44 y RNU48 como controles endógenos, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a su estabilidad entre diversos candidatos como se menciona en la tesis de Romero-Córdoba <sup>137</sup>. Los parámetros del programa fueron ajustados a una CT máxima de 35 lo que nos permitió hacer más astringentes los resultados obtenidos, utilizando además el método de normalización con la media geométrica, que considera todos los valores de distribución y es menos sensible a valores extremos. La tasa de valor de cambio o Fold fue representado mediante la expresión log<sub>2</sub>RQ lo que nos permite interpretar de

forma más clara la reducción o aumento en la expresión de un miRNA. Se consideró como miRNAs con expresión diferencial aquellos que tuvieron una tasa de valor de cambio de  $\pm 2$  con respecto al control (que expresado en  $\log_2$ , equivale a  $\log_2 RQ \pm 1$ ) y que poseyeran una confianza estadística o valor de P de 0.5

### **9. Análisis bioinformáticos.**

La información obtenida de los miRNAs modulados diferencialmente fue recopilada de diversas bases de datos. Para la predicción de los blancos de los miRNAs “estrella” se ocupó miRDataBase (<http://mirdb.org/miRDB/>) y para el resto de miRNAs se empleó TargetScan Versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), así como la base de datos miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>), en ellos se utilizaron los parámetros que los programas generan por defecto.

La búsqueda de las vías de señalización en las cuales participan los blancos predichos se realizó con el software Diana-mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>), utilizando como parámetros la base de humanos, la predicción de TargetScan5 y realizando análisis individuales o de múltiples miRNAs según se requirió.

Para el análisis de enriquecimiento y ontología realizado con las listas de blancos de miRNAs, así como genes modulados en microarreglos de expresión,

se utilizó la base DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Para ello las listas de genes ingresadas a esta base de datos fueron transformadas al nombre oficial del gen (Oficial Gene Symbol) con el software SOURCE (<http://puma.princeton.edu/cgi-bin/source/sourceResult>). El análisis en DAVID fue realizado con el identificador GENE SYMBOL, seleccionando el tipo de lista "Gene List". Los resultados fueron depurados a genes para la especie *Homo sapiens*, y se utilizó la herramienta de anotación funcional (Functional Annotation Tool). En este apartado se seleccionaron 1) las categorías funcionales SP\_PIR\_KEYWORDS, 2) la ontología génica (Gene Ontology) categorías; GOTERM\_BP\_FAT (Biological Process), GOTERM\_CC\_FAT (Celular Component) y GOTERM\_MF\_FAT (Molecular Function) y 3) Rutas de señalización BIOCARTA y KEGG PATHWAY. Los diversos datos obtenidos de esta base de datos fueron resumidos en tablas o representados en gráficos según el caso requerido.

En el caso de la recopilación de los datos de localización genómica, conversión de los nombre de miRNAs estrella a su nombre actual y la secuencia del transcrito de miRNA, se utilizaron las bases de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>) y microcosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>).

El análisis de microarreglos de expresión génica se realizó con el software ANAIS (<http://anais.versailles.inra.fr/>). Para ello los datos crudos del

microarreglo fueron transformados a valores de lectura con el programa DEVA de NimbleGen. Este listado fue ingresado a Anais utilizando los parámetros establecidos por defecto en este programa. Los resultados de cada sonda por triplicado fueron separados mediante una macro diseñada en Excel con el fin de calcular la tasa de valor de cambio ( $\text{Fold} = \text{Media problema}/\text{Media control}$ ) expresada en  $\log_2$ , además de realizar un análisis T-Student obteniendo de esta manera el valor de P.

Finalmente, para el análisis de redes de interacción de proteínas se ocupó el software STRING (<http://string-db.org/>). La lista de proteínas ingresadas correspondió a los blancos predichos del miR-944 por TargetScan así como a los genes modulados por efecto de la transfección del mismo miRNA. Dichos listados fueron primero transformados al nombre oficial del gen con el software SOURCE e ingresados bajo la ventana de múltiples secuencias para el *Homo sapiens*. Las redes obtenidas fueron depuradas eliminando las proteínas sin y con bajas interacciones.

#### **10. Análisis de la expresión de miRNAs con sondas individuales.**

La validación de los arreglos de expresión TLDA, así como la evaluación de la expresión de los miRNAs miR-944 y miR-18b en un set independiente de muestras y la verificación de la correcta transfección/inhibición de estos mismos miRNAs en células MDA-MB-231 y MCF-7 requirió de la evaluación de su expresión con sondas TaqMan (RT-PCR) específicas para cada miRNA



analizado. El uso de los primers stem-loop RT MicroRNA (Applied Biosystems), requirió de la conversión a cDNA del miRNA maduro analizado. Para ello, 5  $\mu$ l (60-100 ng/ $\mu$ l) de RNA total, son sumados a la mezcla que contiene: 3  $\mu$ l de primers RT MicroRNA; 0.15  $\mu$ l de dNTPs con dTTP (100mM); 1.0  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ $\mu$ l); 1.5  $\mu$ l de buffer RT 10X; 0.19  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (20 U/ $\mu$ l) y 4.16  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, que en total suman 15  $\mu$ l por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo. La reacción de RT se realizó en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems), programando tres temperaturas a 16°C por 30 min; 42°C por 30 min; y 85°C por 5 min, más un paso final a 4°C $\infty$ . La reacción de PCR en tiempo real requirió para cada miRNA; 1.33  $\mu$ l del producto de la reacción de RT, son mezclados con 10  $\mu$ l del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No 4 AmpErase UNG, 2X), más 7.67  $\mu$ l de agua libre de RNAsas, y 1.0  $\mu$ l de la sonda PCR (específica para cada miRNA), dando un total de 20  $\mu$ l.

El análisis se realizó en un equipo 7500 de Applied Biosystems. La reacción se llevo a cabo programando un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Los resultados fueron analizados mediante un análisis Delta CT y la tasa de valor de cambio expresada en log<sub>2</sub>.

## 11. Cultivo de líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75 y T47-D.

Las células adherentes de carcinoma mamario humano T47-D, fueron cultivadas en botellas de 25 cm<sup>2</sup> en 5 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium/HamsF12 (DMEM/HamsF12) (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El resto de las líneas celulares fueron cultivadas con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron pases cuando la confluencia alcanzo el 80%. Para esto, se desecho el medio de cultivo, lavando con 2 ml de PBS pH 7.0 y se despegaron las células con 1.5 ml de PBS pH 7.0 EDTA 0.2% estéril, a los cuales se agregaron 64 µl de tripsina al 0.25%. Se incubaron a 37°C por 3 min y se despegaron las células de la caja con golpes suaves, para después disgregarse con la pipeta y cuantificar el número de células. Las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio de cultivo DMEM complementado a 37°C inoculando nuevamente en botellas de cultivo desechables de 25 cm<sup>2</sup>. Para los distintos ensayos realizados en este proyecto las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 80%.

## 12. Lisis y extracción de RNA total de líneas celulares.

La extracción de RNA total de las células MCF-7 y MDA-MB-231, fue realizada con 1 ml de trizol por cada caja de 25 cm<sup>2</sup> golpeando y agitando suavemente las células hasta que estas son despegadas de la caja. El lisado fue recuperado en un microtubo e incubado durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de disociar los complejos de nucleoproteínas.

Posteriormente, se añadieron 0.3 ml de cloroformo y se mezclaron los reactivos por inversión durante 15 seg. El microtubo se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior incolora. Se recuperaron 400 µl de la fase superior la cual contiene el RNA y se añadieron 200 µl de isopropanol para precipitar durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4°C a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con etanol al 100%. Posteriormente, se realizó otra centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5 min. El RNA fue finalmente resuspendido en un volumen de 20 µl de agua libre de RNAsas, cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1%.

### **13. Transfección de las moléculas precursoras e inhibidoras de miRNAs.**

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas con la molécula precursora del miR-944 y miR-139-5p, así como con las moléculas inhibidoras del miR-18b y miR-130b. Para esto, un día antes de la transfección, células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 y 48 pozos como se describió anteriormente. Al día siguiente, para el caso de las cajas de 48 pozos se preparó un mezcla de 25  $\mu$ l de medio Opti-Mem con 1.5  $\mu$ l del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) por cada pozo a transfectar y se incubó durante 10 min a T.A. Esta última se combinó las moléculas precursoras o inhibidoras previamente diluidos en 25  $\mu$ l de medio Opti-Mem en concentraciones de 25-200 nM. Esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (450  $\mu$ l de medio y 50  $\mu$ l de la mezcla de transfección). La expresión relativa de los miRNAs expresados y reprimidos fue evaluada a las 48 hrs, mediante RT-PCR. Cuando la transfección para los precursores e inhibidores fue realizada en cajas de 6 pozos, las cantidades de las mezclas fueron escaladas 3X.

### **14. Hibridación de microarreglos de expresión génica.**

Se analizó la expresión génica de la línea celular MDA-MB-231 y MCF-7 sin transfectar y transfectada con las moléculas precursoras o inhibidoras de miRNAs (50 nM-48 hrs) utilizando microarreglos de expresión génica con el sistema Human Microarray V3 (Invitrogen). Este consta de laminillas de vidrio recubiertas de epóxido, prebloqueadas con cubreobjetos que permiten hibridar

volúmenes de 80  $\mu$ l. Cada lámina contiene el genoma humano completo dispuesto en bloques con tres sondas por gen, además de poseer controles intra e interespecíficos que permitan validar el resultado obtenido. Se utilizaron 2  $\mu$ g de RNA total (control y sin transfectar) el cual fue marcado diferencialmente. Dicho marcaje, consiste en la adición de un fluoróforo (AlexaFluor3 o AlexaFluor5 en el 3') mediante un el tracto de poliA. Finalmente, se hibridaron los microarreglos durante toda la noche a 42°C en cámaras de hibridación húmeda (Corning) para laminillas de 25x75 mm. Las laminillas se lavaron con solución de SDS-0.1%/SSC-0.1X y se analizaron en un scanner Axon, GenPix4000A (Molecular Devices). Mediante el uso del software GenPix Pro, se eliminó el ruido de fondo, se normalizaron los datos y se capturaron los datos de intensidad de fluorescencia de cada spot.

### **15. Validación de los microarreglos de expresión.**

Con el fin validar los resultados obtenidos en el microarreglo de expresión génica de células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-944, se realizaron ensayos RT-PCR con sondas específicas para ocho genes que fueron reprimidos en dicho arreglo. Estos genes fueron seleccionados considerando los blancos predichos como blanco del miR-944 acorde a la base de datos TargetScan y la base de datos miRecords. Los genes que concordaron entre ambas bases (un total de 56) y que poseen una función en migración fueron elegidos como genes para validación. Para ello se diseñaron los oligos:

PRKCa	Forward	5'CGGGATAAACCTAATCACTG3',
PRKCa	Reverse	5'GACAGTTATCAACCAAGGAG3';
MCL1	Forward	5'CTGTAAGTGCAATAGTTGAC3',
MCL1	Reverse	5'TCTTGTTAGCCATAATCCTC3';
BRIP1	Forward	5'CACCTGAACTTTATGATCCT3',
BRIP1	Reverse	5'GTTAGCCAATCTATTTCTC3';
MTDH	Forward	5'GTTGAAAGAGAATCACCTG3',
MTDH	Reverse	5'GGTTAGAAATCATCGTCCTG3',
PAK2	Forward	5'CTTTGATGCTGTTACTGGAG3',
PAK2	Reverse	5'AGTTTGGTGATATTGGAGGT3';
PDPK1	Forward	5'GCAGAATGACTACGAATAGG3'
PDPK1	Reverse	5'CCAACATCCAACCTTACTTACAG3';
SCD	Forward	5'TAGACAACCTTTCTGTAGCC3',
SCD	Reverse	5'TTTATCTCTAGCTCAAGCCA3';
SIAH1	Forward	5'TTTCCTTTAACTGACAAGCC3',
SIAH1	Reverse	5'CAGCACTATGTATTGACTCAC3'.

Con ellos se evaluó la expresión de dichos genes mediante PCR punto final y tiempo real, comparando su expresión entre células transfectadas y no transfectadas. Para la mezcla de reacción para PCR punto final se utilizó PCR-buffer 10x (2.5 µl), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (4.5 µl), dNTPs 2 mM 10x (2.5 µl), Oligo 100 µM (1 µl por oligos), Taq-polimerasa 5 U/µl (0.25 µl), H<sub>2</sub>O libre de nucleasas

(18.5  $\mu$ l), cDNA (1  $\mu$ l). El producto de la reacción fue sometido a electroforesis en geles de agarosa-TAE al 1.5% y visualizados en un equipo transiluminador.

#### **16. Evaluación de la viabilidad celular por ensayos MTT.**

Con el fin de evaluar el efecto de la expresión del miR-944, miR-18b, miR-130b y miR-139-5p en la viabilidad celular, células MCF-7 y MDA-MB-231, transfectadas previamente con las moléculas precursoras o inhibidoras de miRNAs (como se mencionó anteriormente) fueron sometidas a un ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen). Para ello, 5mg de MTT fueron solubilizados en 1 ml de PBS. Posteriormente, a cada pozo que fue evaluado (excepto el blanco) se agregaron 400  $\mu$ l de medio DMEM debidamente complementado más 100  $\mu$ l de MTT previamente solubilizado. Después de una incubación de 2 h, esta mezcla fue retirada y el formazán es solubilizado con 500  $\mu$ l de una solución de Isopropanol, 4 mM HCl, 0.1% NP-40, durante 5 min en agitación. La absorbancia es medida con un lector de Elisa a 570 nm con una lectura de referencia a 630 nm. El valor de absorbancia de las células control fue tomado como el valor de viabilidad inicial expresado en porcentaje.

#### **17. Ensayo Wound-healing de migración.**

Con el fin de evaluar el efecto de las moléculas precursoras e inhibidoras de miRNAs en la migración celular, células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas como se ha descrito previamente en cajas de seis pozos, las

cuales contienen un cubreobjetos en su base sobre el cual se ha establecido la monocapa. 24 horas posterior a la transfección, mediante una punta de plástico de 10  $\mu$ l se trazó una línea sobre la monocapa dispuesta en la superficie del cubreobjetos. Las células fueron lavadas en dos ocasiones con 2 ml de PBS inmediatamente después realizar la herida e incubadas en medio debidamente complementado. La restauración de la monocapa fue evaluada a las 4 y 24 h posteriores a la herida, para lo cual las células sobre el cubreobjetos fueron lavadas en dos ocasiones con 2 ml de PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min y montadas sobre portaobjetos. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio de epifluorescencia. El conteo de células que migran al espacio abierto se realizó de forma manual y se expresó en porcentaje, considerando a la totalidad de células migrantes en la condición control (células únicamente con el reactivo de transfección sin precursor/inhibidor) como un 100%.

#### **18. Ensayo de migración celular en cámaras transwell.**

La migración celular fue evaluada mediante un segundo método que consiste en el uso de cámaras transwell (Corning, poro 0.8 micras). Células MDA-MB-231 y MCF-7 previamente transfectadas (24 h, en placas de 6 pozos) con las moléculas precursoras e inhibidoras de miRNAs (50 mM) fueron sembradas en cámaras transwell (aprox 100, 000 células por cámara). En el pozo superior el medio de cultivo carece de suero fetal bovino, mientras que el de la cámara inferior se encuentra debidamente complementado funcionando



como quimioatrayente. Al día siguiente de la resiembra, el número de células que atravesaron la membrana y se establecieron en el fondo del pozo inferior fueron contabilizadas. Se considero como referencia la cantidad de células que migran en la condición control (células únicamente con el reactivo de transfección sin precursor/inhibidor). Dicho conteo se realizo de forma manual y se expreso en porcentaje, considerando a la totalidad de células migrantes en la condición control (células únicamente con el reactivo de transfección sin precursor/inhibidor) como un 100%.

#### **19. Ensayo de invasión celular en cámaras transwell.**

La invasión celular fue evaluada mediante el uso de cámaras transwell (Corning, poro 0.8 micras) con una base de matrigel (Basement Membrane Matrix - BD Biosciences) la cual solo es degradada por células invasivas mediante la secreción de proteasas. Células MDA-MB-231 y MCF-7 previamente transfectadas (24 h, en placas de 6 pozos) con las moléculas precursoras e inhibidoras de miRNAs (50 mM) fueron sembradas en cámaras transwell con una base de matrigel (aprox 100, 000 células por cámara). En el pozo superior el medio de cultivo carece de suero fetal bovino, mientras que el de la cámara inferior se encuentra debidamente complementado funcionando como quimioatrayente. Al día siguiente de la resiembra, el número de células que atravesaron la membrana y se establecieron en el fondo del pozo inferior fueron contabilizadas. Dicho conteo se realizo de forma manual y se expreso en porcentaje, considerando a la totalidad de células invasivas en la condición

control (células únicamente con el reactivo de transfección sin precursor/inhibidor) como un 100%.

## **20. Extracción de proteínas de células transfectadas con el pre-miR-944.**

Células transfectadas con el pre-miR-944, con la secuencia Scramble y con el agente transfectante (controles), fueron lisadas en 500  $\mu$ l de buffer TNTE frío (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.5%, EDTA 5mM) junto con 20  $\mu$ l del coctel de inhibidores de proteasas "Complete" (Roche) adicionados al momento de la extracción. La lisis se llevo a cabo dentro de las cajas de cultivo puestas en agitación a 4°C. La lisis se realizo durante un periodo de 5 min. Posteriormente el lisado se recupero y se centrifugó a 14,000 rpm 5 min 4°C. El sobrenadante se recuperó y se cuantifico mediante el método de Bradford (Bio-Rad) en un equipo ELISA.

## **21. Ensayos Western Blot.**

Los cambios en la expresión de proteínas pertenecientes a los complejos de adhesión focal fueron evaluados mediante ensayos Western Blot de proteínas de células MDA-MB-231 transfectadas con 50 nM del pre-miR-944, 50 nM de Scramble y células con el agente transfectante. Para ello 50  $\mu$ g de estas proteínas fueron cargados en geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras previamente calentadas a 100°C y diluidas en buffer de carga 1X con betamercaptoetanol, fueron sometidas a electroforesis a una velocidad inicial de 60 volts (hasta alcanzar el gel stacking) y posterior a 150 volts. Los geles

fueron equilibrados por 10 min y transferidos en pares a membranas de nitrocelulosa (Bio-rad), empleando la cámara semiseca (Bio-rad) con voltaje de 18 volts durante 40 min. Las membranas fueron bloqueadas con PBS/Tween 0.5%-leche 5% durante 1 h. La membrana fue lavada en PBS y los anticuerpos primarios fueron incubados con PBS/Tween 0.5% a 4°C durante toda la noche y utilizados en las siguientes concentraciones  $\beta$ 1-Integrina (sc-H120, conejo 1:750), Talina (sc-H300, conejo 1:750) p-Paxilina (sc-16668, ratón, 1:750), p-FAK (sc-81493, ratón, 1:750), Vinculina (sc-73614, ratón, 1:750), Actina (sc-58679, ratón, 1:750) de Santa Cruz Biotechnology, así como GAPDH (D16H11, Cell Signalling 1:2500). Posteriormente se realizan tres lavados con PBS/Tween 0.5%. Los anticuerpos secundarios fueron incubados en concentraciones de 1:10000 Anti-Ratón (Santa Cruz) y, 1:15000 Anti-Ratón (Santa Cruz) en PBS/Tween 0.5% durante 2 h a temperatura ambiente en las diluciones. Se realizaron tres lavados con PBS/Tween 0.5% y se realizó la detección de proteínas con inmunofluorescencia (Kit ECL Promega). Las tomas fueron realizadas en un equipo ChemiDoc ajustando la lectura para quimioluminiscencia. El anexo A incluye tablas y formularios de las soluciones empleadas en este estudio.

## **22. Ensayo de Inmunofluorescencia.**

Para evaluar la posible alteración de la adhesión focal por efecto de la expresión del miR-944 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra las proteínas de dicha estructura. Para ello, células MDA-MB-231 fueron

transfectadas con el pre-miR-944 (50 nM) y Scramble (50 nM) en cajas de 6 pozos , las cuales contienen un cubreobjetos en su base sobre el cual se ha establecido la monocapa. A las 48 horas postransfección las células sobre el cubreobjetos fueron lavadas en dos ocasiones con 2 ml de PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min, seguido de dos lavados con 2 ml de PBS. En cada paso se elimina todo el líquido mediante succión evitando que la muestra se seque. Las muestras fueron cubiertas con PBS/FBS 10% como solución de bloqueo durante 20 min, esto con el fin de suprimir la unión no específica de IgG. Se realizaron 2 lavados más con PBS y se incubaron los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se utilizaron en las concentraciones siguientes: p-Paxilina (sc-16668, ratón, 1:50), Vinculina (sc-73614, ratón, 1:50), Actina (sc-58679, ratón, 1:50) de Santa Cruz Biotechnology. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS de 5 min en cada ocasión. Se incubó durante 1 h el anticuerpo secundario conjugado con biotina (5 µg/ml en PBS). Ya que este anticuerpo secundario se encuentra conjugado con fluorocromo la incubación se realizó en una cámara oscura. Finalmente las células fueron lavadas con PBS y colocadas en portaobjetos con medio de montaje cubiertas de la luz. Las laminillas fueron visualizadas en el microscopio confocal de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

## V. RESULTADOS.

### 1. Datos clínicos de las pacientes.

A partir de la información proporcionada por el personal del FUCAM, se ha conformado una base de datos que comprende la información clínica de más de 200 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama. Con base en la información contenida en ella se realizó la estratificación de muestras, considerando sólo aquellas biopsias que presentaron un diagnóstico histopatológico ductal positivo y una celularidad tumoral del 70% o superior. La edad de las pacientes registradas en la base de datos fue de 32 años la más joven, hasta 92 años la mujer de edad más avanzada. La edad promedio fue de 55.49 años y la mayor parte de las pacientes se distribuye de manera equitativa entre los 40 y 70 años. Esto concuerda con los datos estadísticos reportados por el IMSS y Rodríguez-Cuevas, quienes mostraron previamente que en nuestro país la edad promedio de mujeres con cáncer de mama es 10 años menos que en Europa.

En lo que respecta al estadio tumoral, el 41% se encontraron en el estadio IIA, seguido del 21% que se encontraron en el estadio I, 18% en el estadio IIB y el resto repartida es diversos estadios. Estos datos muestran una diferencia en la detección realizada por el FUCAM y otras instituciones como el IMSS, siendo la primera organización más efectiva en la detección del cáncer temprano diagnosticando un 80% de sus casos en las etapas TNM I y II,

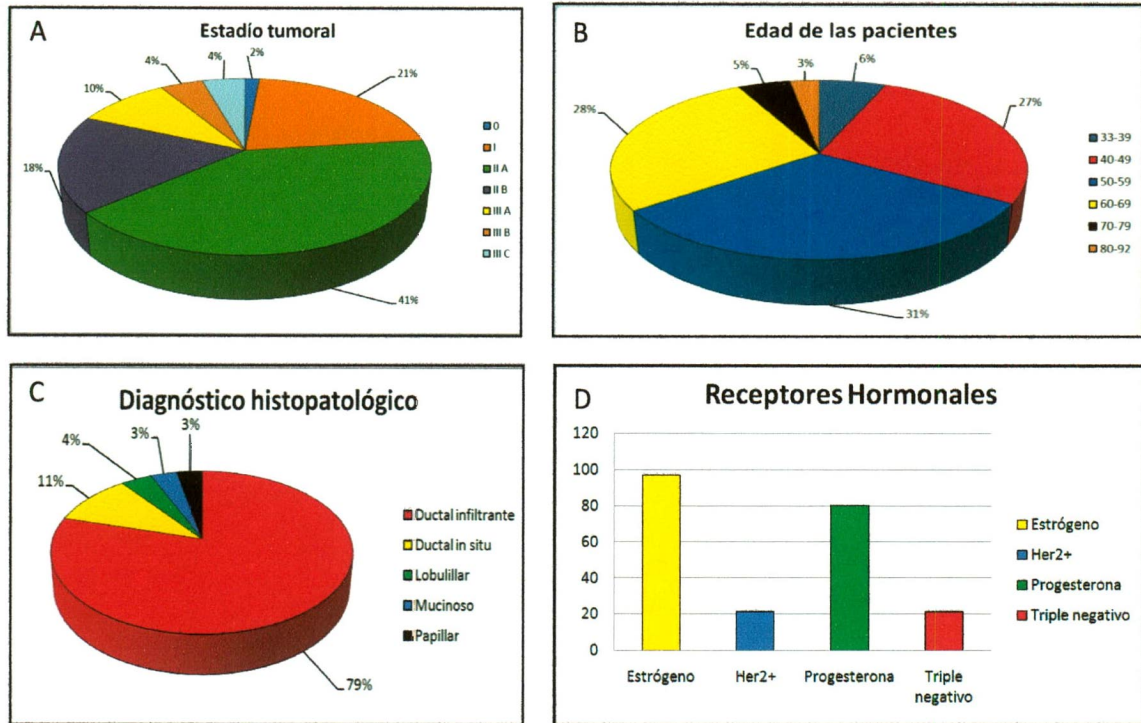
mientras que en la segunda sólo un 20% de sus pacientes diagnosticadas se encuentran en estas etapas. Esto se explica gracias a la estrategia de pesca (campañas de mastografía gratuita y popular) impulsada por el FUCAM que pretende captar mujeres en etapas más tempranas de la enfermedad, llevando los servicios de mastografía a diversas partes de la ciudad donde las mujeres acceden a este beneficio sin importar si son derechohabientes.

Por otra parte, la expresión de receptores fue evaluada mediante inmunohistoquímica por el FUCAM, siendo el receptor de estrógenos el más expresado entre las muestras, estando presente en un 49% de ellas, seguido del receptor de progesterona con 40% y Her2 con un 10%. En cuanto al diagnóstico histopatológico, el 89.46% se clasificó como carcinoma ductal, de estas el 79.3 % fue infiltrante y 10.3 % *in situ*; el resto de las pacientes se clasificaron dentro de otros tipos histopatológicos. Estos datos concuerdan de manera estadística con lo reportado a nivel mundial, lo que sugiere que en las pacientes mexicanas no existen diferencias evidentes en cuanto a la expresión de receptores y diagnóstico histopatológico. Estos datos son resumidos y expresados en las gráficas de la figura 12.

Con base a la expresión de receptores y al subtipo histológico se seleccionaron como muestras precandidatas al estudio, aquellas muestras con diagnóstico histopatológico ductal infiltrante, lo que redujo el set de biopsias a un aproximado de 160 muestras. De ellas se seleccionaron aquellas muestras

que expresaron el receptor Her2+ por lo que se consideraron sólo 21 muestras y de estas sólo 13 mostraron una celularidad tumoral superior al 70%, por lo que fueron seleccionadas y sometidas al proceso de extracción de RNA. Finalmente, 9 de estas muestras alcanzaron un RIN superior a 6, por lo que fueron consideradas adecuadas para el estudio. Las 9 muestras seleccionadas fueron utilizadas para evaluar la expresión de miRNAs mediante TLDA y los datos clínicos correspondientes se resumen en la tabla 6.

Para obtener el perfil de expresión de los miRNAs en los 9 tejidos mamarios tumorales se realizó el análisis ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de los datos de expresión relativa de los miRNAs obtenidos mediante TLDA acorde a lo descrito en la metodología. Los resultados mostraron la presencia de 54 miRNAs con expresión diferencial significativa considerando una tasa de cambio de  $\pm 2.0$  y un valor de P de 0.05 (34 miRNAs reprimidos y 20 sobreexpresados). La firma génica encontrada exhibe un traslape entre los miRNAs expresados entre el tejido mamario normal y el tejido tumoral, indicando que las diferencias en expresión no son simplemente debidas a la heterogeneidad celular o a la variabilidad tumoral de las distintas biopsias.



**Figura 12. Características clínicas de las biopsias que conforman el banco de tumores y tejidos mamarios normales.** Diagramas circulares que muestran las características clínicas de las pacientes expresadas en porcentaje de acuerdo al (A) estadío tumoral, (B) edad de las pacientes y (C) diagnóstico histopatológico. (D) Diagrama de barras que muestra el número de muestras que expresan alguno de los receptores hormonales. n= 196 biopsias.



**Tabla 6. Características clinicopatológicas de los tumores mamarios analizados por TLDA.**

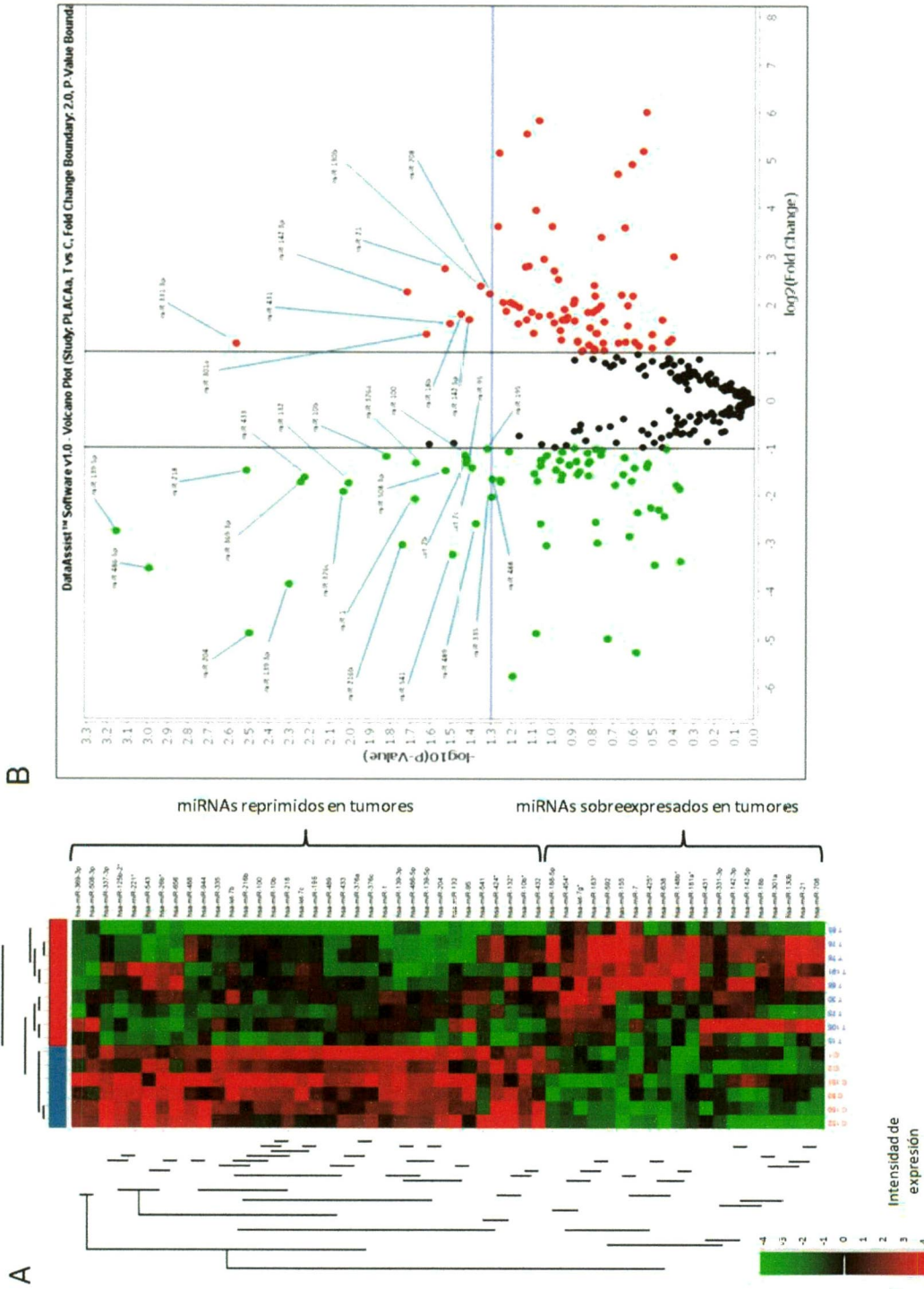
Paciente	Edad	Estado clínico	Grado tumoral	Clasificación	Tamaño tumoral (mm)	Subtipo histológico	HER2	RE	RP
15	45	ND	2	Her2	35	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	+
30	41	0	2	Luminal B	20	Carcinoma ductal <i>In situ</i>	+	+	+
75	50	IIB	2	Her2	25	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	-
76	49	IIB	3	Her2	20	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	-
78	81	IIIB	3	Her2	47	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	-
85	47	IIA	3	Her2	27	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	+
88	63	I	ND	Luminal A	15	Carcinoma ductal infiltrante	+	+	-
105	39	IIIC	2	Her2	23	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	+
191	55	IIB	ND	Her2	39	Carcinoma ductal infiltrante	+	-	-

RE, Receptor de estrógenos. RP, Receptor de progesterona. HER2, Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano. ND, No determinada.

## 2. Análisis de la expresión de miRNAs en tumores mamarios

Los 54 miRNAs que presentaron cambios significativos en su expresión fueron visualizados en un mapa de calor organizado mediante un análisis jerárquico el cual nos permite discernir que existen diferencias de expresión entre el tejido mamario normal y el tumoral. En la figura 13A, se aprecia en color verde el grupo de miRNAs reprimidos y en rojo los miRNAs que se encuentran sobre expresados en los tumores. Una segunda forma de visualizar estos datos es a través de un gráfico de volcán. Este es la representación de la tasa de valor de cambio expresada en ( $\log_2 RQ$ ) en relación con el valor de P (expresado en  $\log_{10}$ ), lo que nos permite ver los miRNAs que modulan su expresión por arriba de la línea de corte que en este caso fue de  $P=0.05$ . Con este tipo gráfico visualizamos la totalidad de los miRNAs que se modularon en el perfil de expresión y los 54 miRNAs que superan la línea de corte con una tasa de valor de cambio  $\pm 2$  y un valor  $p=0.05$  (figura 13B).

Entre los miRNAs modulados significativamente figuran algunos previamente reportados en cáncer de mama tales como son el miR-7, miR-10b, miR-21, miR-100, miR-155, miR-195, miR-204, miR-221 y miR-218. La lista de los 54 miRNAs que modulados en las biopsias tumorales se aprecia en la tabla 7. En ésta se muestra el nombre del miRNA, su tasa de valor de cambio (Fold change=  $\log_2 RQ$ ), el valor de expresión relativa (RQ), el valor de P, el *locus* o localización cromosómica y sí el miRNA en cuestión se encuentra en regiones de ganancia o pérdida génica.



**Figura 13. Expresión diferencial de miRNAs en tumores mamarios.** La figura muestra las representaciones gráficas del perfil de expresión de miRNAs. (A) Mapa de calor que se obtiene al analizar los 54 miRNAs diferenciales en el grupo de tumores analizados. Se aprecia en color verde los miRNAs reprimidos y en rojo los miRNAs sobreexpresados. Es notable que los miRNAs muestran una expresión inversa entre el tejido normal y tumoral. (B) Gráfico volcán que muestra la totalidad de miRNAs en el perfil de expresión y las líneas de corte de tasa de cambio ( $\log_2 \pm 1 = \text{Fold change 2}$ ) y valor de P ( $-\log_{10} P\text{-value}$ ). Los 54 miRNAs que conforman el perfil superan ambos límites.

**Tabla 7. MicroRNAs modulados en los nueve tumores ductales invasores analizados por TLDA**

Reprimidos	Tasa de valor de cambio (log2 RQ)	RQ-value	P-value	Locus	Alteración génica reportada en cáncer de mama *
hsa-miR-204	-4.87	0.0342	0.003	9q21.12	No
hsa-miR-139-3p	-3.86	0.0691	0.005	11q13.4	No
hsa-miR-125b-2*	-3.54	0.0859	0.038	21q21.1	No
hsa-miR-486-5p	-3.53	0.0866	0.001	8p11.21	Ganancia
hsa-miR-541	-3.25	0.1054	0.032	14q32.31	No
hsa-miR-216b	-3.04	0.1213	0.018	2p16.1	No
hsa-miR-139-5p	-2.76	0.1481	0.001	11q13.4	No
hsa-miR-489	-2.60	0.1650	0.042	7q21.3	No
hsa-miR-1	-2.08	0.2373	0.021	20q13.33	No
hsa-miR-335	-2.04	0.2428	0.051	7q32.2	No
hsa-miR-376c	-1.93	0.2623	0.009	14q32.31	No
hsa-miR-132*	-1.89	0.2697	0.021	17p13.3	No
hsa-miR-132	-1.75	0.2973	0.010	17p13.3	No
hsa-miR-369-3p	-1.73	0.3009	0.006	14q32.31	No
hsa-miR-944	-1.72	0.3028	0.025	3q28	No
hsa-miR-488	-1.66	0.3157	0.051	1q25.2	No
hsa-miR-433	-1.62	0.3247	0.006	14q32.2	No
hsa-miR-424*	-1.60	0.3296	0.001	Xq26.3	No
hsa-miR-508-3p	-1.49	0.3566	0.030	Xq27.3	No
hsa-miR-218	-1.49	0.3568	0.003	4p15.31	No
hsa-miR-337-3p	-1.47	0.3612	0.044	14q32.2	No
hsa-miR-10b*	-1.45	0.3648	0.001	2q31.1	Ganancia
hsa-let7c	-1.42	0.3739	0.040	21q21.1	Ganancia
hsa-let7b	-1.34	0.3962	0.038	22q13.31	No
hsa-miR-376 <sup>a</sup>	-1.32	0.4011	0.021	14q32.31	No
hsa-miR-26b*	-1.29	0.4093	0.006	2q35	No
hsa-miR-656	-1.26	0.4161	0.018	14q32.31	No
hsa-miR-95	-1.26	0.4165	0.038	4p16.1	No
hsa-miR-221*	-1.24	0.4243	0.016	Xp11.3	No
hsa-miR-543	-1.20	0.4361	0.014	14q32.31	No

## Resultados

hsa-miR-10b	-1.18	0.4420	0.015	2q31.1	No
hsa-miR-100	-1.18	0.4427	0.037	11q24.1	Pérdida
hsa-miR-432	-1.05	0.4816	0.035	14q32.2	No
hsa-miR-195	-1.03	0.4898	0.048	17p13.1	Ganancia
Sobreexpresados	Tasa de valor de cambio (log2 RQ)	RQ-value	P-value	Locus	Ganancia/Perdida*
has-miR-155	11.91	3849.69	0.019	21q21.3	No
hsa-miR-592	4.43	21.4937	0.003	7q31.33	No
hsa-miR-638	3.14	8.8009	0.035	19p13.2	No
hsa-miR-183*	3.08	8.4533	0.005	7q32.2	No
hsa-miR-21	2.73	6.6543	0.029	17q23.1	Ganancia
hsa-miR-130b	2.37	5.1594	0.044	22q11.21	No
hsa-miR-142-3p	2.26	4.7981	0.019	17q22	Ganancia
hsa-miR-708	2.22	4.6601	0.049	11q14.1	No
hsa-miR-181a*	2.16	4.4810	0.044	1q32.1	Ganancia
hsa-let7g*	2.10	4.2809	0.004	3p21.1	Pérdida
hsa-miR-148b*	2.10	4.2749	0.010	12q13.13	No
hsa-miR-18b	1.80	3.4850	0.035	Xq26.2	Ganancia
hsa-miR-454*	1.79	3.4608	0.007	17q23.2	Ganancia
hsa-miR-7	1.71	3.2647	0.031	9q21.32	No
hsa-miR-142-5p	1.68	3.2130	0.039	17q22	Ganancia
hsa-miR-431	1.60	3.0374	0.031	14q32.2	No
hsa-miR-301 <sup>a</sup>	1.38	2.6071	0.024	17q22	Ganancia
hsa-miR-188-5p	1.32	2.5022	0.026	Xp11.23	No
hsa-miR-331-3p	1.19	2.2822	0.003	12q22	No
hsa-miR-425*	1.18	2.2718	0.041	3p21.31	Ganancia

\* Acorde a los datos reportados por Selcuklu SD et al., 2009<sup>138</sup>. Los microRNAs indicados se encuentran en regiones con ganancia o perdida genética frecuente en diversos carcinomas.

Log2 RQ= Logaritmo en base dos de la cuantificación relativa.

RQ-Value= Cuantificación relativa

P-Value= Valor de P

Posteriormente agrupamos los miRNAs de acuerdo a su localización génica. Ello nos permitió encontrar que nueve miRNAs con expresión reprimida se localizan en el cromosoma 14, específicamente en la región 14q32.2. La tabla 8 resume el número de miRNAs alterado en cada cromosoma y el estatus (reprimido, sobreexpresado) en que se encuentran.

Así mismo, encontramos que 24 de los 54 miRNAs que conforman el perfil se expresan o reprimen como clúster, y que esta modulación podría darse en gran medida por la amplificación o delección de material genético en los tumores mamarios. Como ejemplo tenemos el clúster 14q32.31 en el cual se localizan 9 miRNAs reprimidos y que es una región comúnmente deletada en otros tipos de cáncer como mieloma, melanoma y osteosarcoma <sup>137, 144, 250, 270</sup> mientras que en cáncer de mamá esta región no se encuentra frecuentemente deletada <sup>294</sup>.

Cabe mencionar que existen casos donde la expresión de los miRNAs no correlaciona con la ganancia o pérdida de material genético, lo que sugiere que su regulación es mediante otros mecanismos aún no determinados. Tal es el caso del clúster ubicado en la posición 21q21.1 que contiene a Let-7c y miR-125b-2, cuya expresión se reprime aunque no exista delección del material genético. También es el caso de los miRNAs Let-7g y miR-425 ubicados en la posición 3p21 y que se sobreexpresan en cáncer de mama sin que exista amplificación genética.

**Tabla 8. Localización cromosómica de los miRNAs desregulados en tumores mamarios.**

Cromosoma	miRNAs modulados	Expresión de los miRNAs
1	2	1↓ 1↑
2	4	4↓
3	3	1↓ 2↑
4	2	2↓
7	4	2↓ 2↑
8	1	1↓
9	2	1↓ 1↑
11	4	3↓ 1↑
12	2	2↑
14	10	9↓ 1↑
17	8	3↓ 5↑
19	1	1↑
20	1	1↓
21	3	2↓ 1↑
22	2	1↓ 1↑
X	5	3↓ 2↑

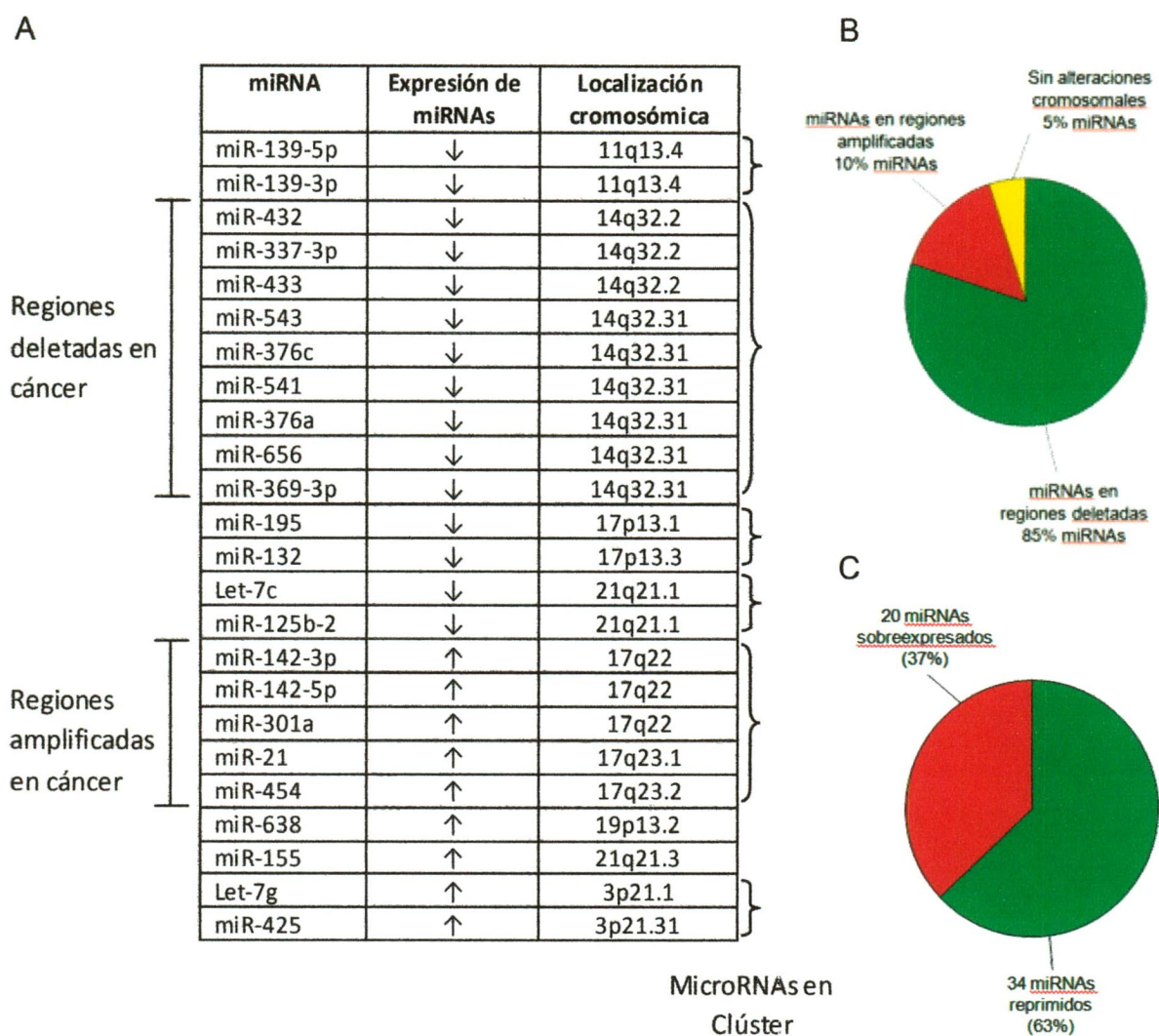
La tabla muestra el número de miRNAs modulados en nuestro perfil presente en cada cromosoma. También se simboliza el estatus de expresión (↑ sobreexpresado, ↓reprimido).

Al graficar el porcentaje de miRNAs que se asocian a regiones deletadas y amplificadas en diversos tumores y compararlo con el porcentaje de miRNAs modulados, los resultados sugieren una correlación en la tendencia entre el número de miRNAs que encontramos reprimidos/expresados y la cantidad de miRNAs que han sido reportados en regiones deletadas y amplificadas en diversos tipos de cáncer. La figura 114 muestra los 24 miRNAs que encontramos en clúster y su asociación con regiones deletadas o amplificadas en diversos tumores.

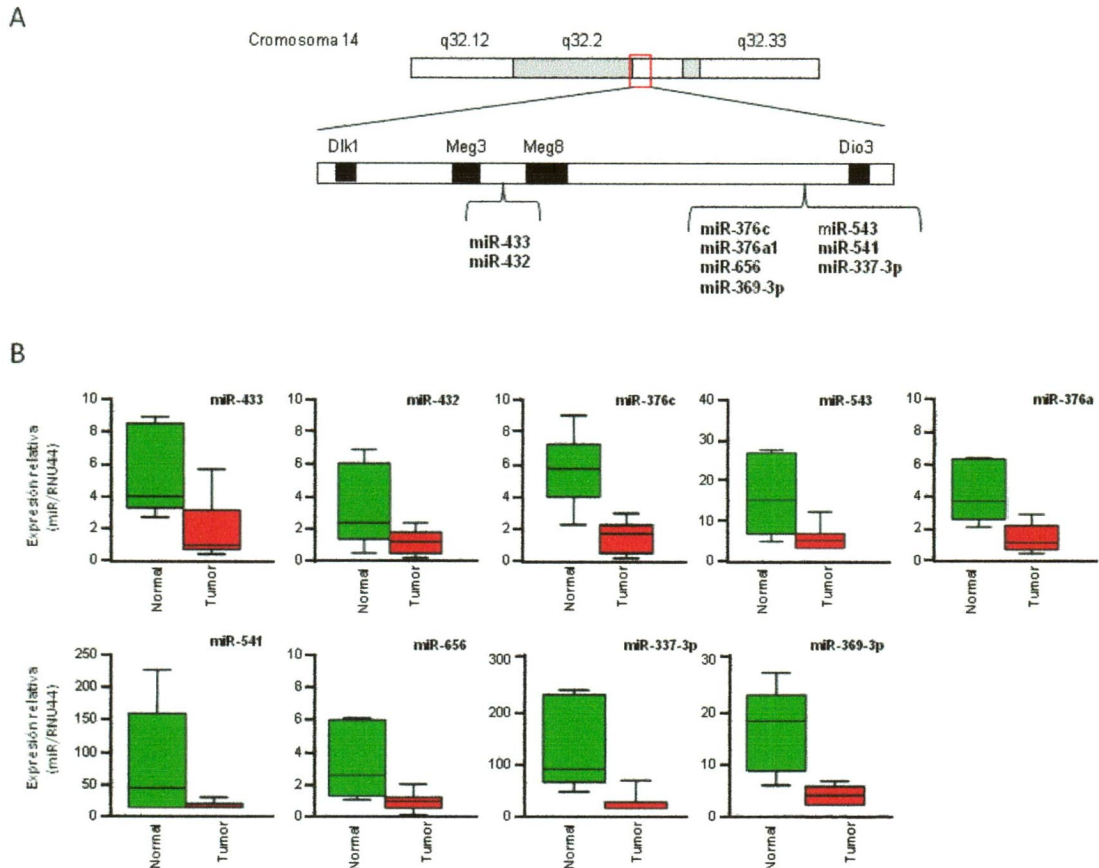
### **3. Los miRNAs del clúster 14q32 se reprimen en los tejidos tumorales.**

Uno de los datos más interesantes encontrados en nuestro análisis es la presencia de 9 miRNAs reprimidos en los tumores mamarios, los cuales se ubican en el clúster 14q32 (Figura 15). Más de 40 miRNAs se encuentran presentes en esta región localizada entre los genes improntados DLK1 y DIO3. Este clúster ha sido identificado como deletado en otro tipo de tumores como en el osteosarcoma y melanoma en donde la baja expresión de los miRNAs de este locus ha sido correlacionada con el desarrollo de metástasis <sup>137, 144</sup>. La delección de este clúster y su relación con la metástasis se apoya en el hecho de que los genes CDK5 y TWIST1 que favorecen dicho proceso son significativamente enriquecidos en tumores con bajos niveles de miRNAs pertenecientes al *locus* 14q32, mientras que los genes como IFNB1, TEK y COL18A1, cuya función es reprimir la metástasis son reprimidos en estos mismos tumores <sup>144, 150, 298</sup>.





**Figura 14. Expresión de miRNAs en diversos clústers y su relación con la amplificación y delección del material genético.** (A) El gráfico muestra los miRNAs que encontramos modulados organizados por clúster de expresión (ubicados con llaves a la derecha de la tabla). Es posible observar como el estatus de los miRNAs coincide en su gran mayoría con la delección/amplificación del material genético en el cual se localizan dichos miRNAs. (B) Porcentaje de miRNAs que han sido reportados en regiones alteradas en distintos tipos de cáncer. (C) miRNAs modulados expresados en porcentajes.



**Figura 15. Expresión de los miRNAs localizados en el clúster 14q32.** (A) Esquema de la localización de los 9 miRNAs ubicados en el locus 14q32. (B) Expresión relativa entre la expresión del tejido mamario normal y la encontrada para los miRNAs localizados en este clúster. Los diagramas de caja muestran la distribución de los datos de expresión relativa para los miRNAs del cluster 14q32 encontrada en los tejidos mamaros normales y tumorales analizados por TLDA. Los valores de Ct de cada miRNA fueron analizados mediante un análisis  $\Delta$ ct y normalizados con los valores del RNU-44 y RNU-48 para posteriormente ser graficados mediante cuadriles. En verde se muestran los datos correspondientes al tejido normal y en roja al tejido tumoral.

Otro ejemplo es TK1, un gen que correlaciona de manera negativa con los miRNAs del *locus* 14q32. Su importancia radica en que este gen está expresado en células proliferativas correlacionando con un mal pronóstico en múltiples cánceres como pulmon, esfago y mama<sup>137, 296, 297</sup>.

Un mecanismo que explica la supresión de este grupo de miRNAs en los tumores analizados además de la delección, puede ser un mecanismo de regulación epigenética, sin embargo para corroborar esta teoría es necesario realizar experimentos adicionales. En conclusión, los genes y los miRNAs de este clúster podrían ser blanco potencial de tratamiento en pacientes metastásicos o ser utilizados como marcadores de pronóstico tal como ha sido propuesto por Sarver *et al*, 2013<sup>298</sup>.

#### **4. Validación de la expresión de miRNAs obtenido por TLDA.**

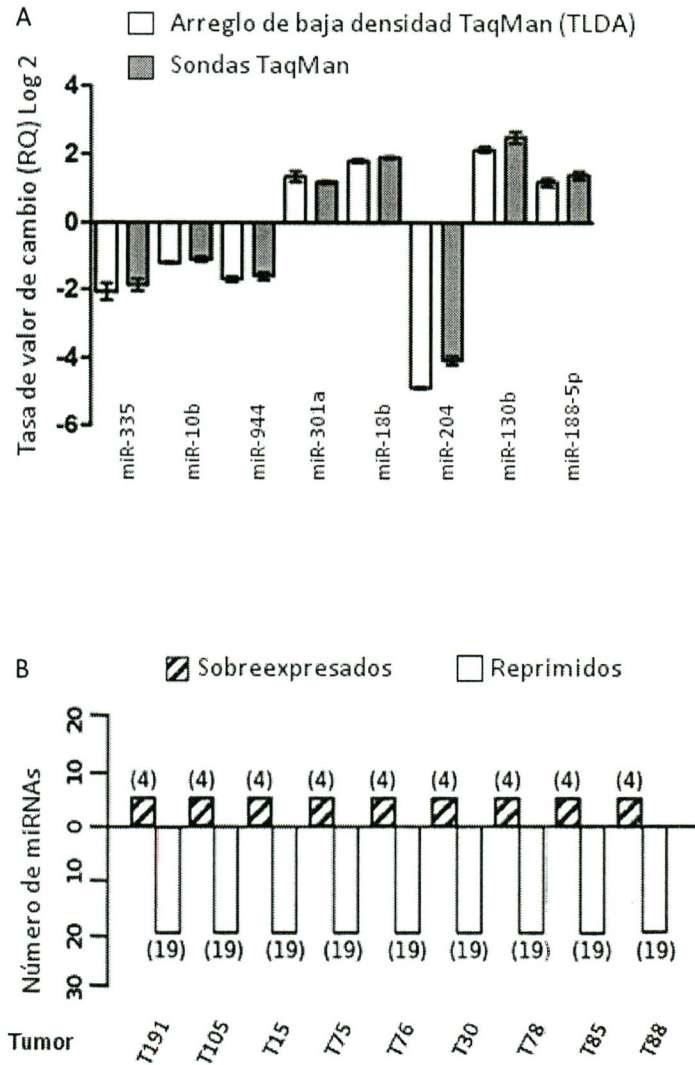
El perfil de expresión global de miRNAs obtenido mediante los arreglos TaqMan de baja densidad (TLDA), mostró que es posible analizar de manera sencilla la expresión de estas moléculas en una sólo reacción de PCR. Por ello es válido cuestionar si los resultados de expresión TLDA de un solo miRNA son reproducibles al evaluarlo de manera individual. Para corroborar que la expresión de los miRNAs analizados de manera conjunta mediante TLDA es reproducible en análisis individuales, se seleccionaron ocho miRNAs modulados (miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-155, miR-335, miR944, miR-18b, miR-204) los cuales fueron evaluados mediante PCR en tiempo real, con sondas específicas y se compararon los resultados con los obtenidos con TLDA. Los

resultados del promedio de Ct para estos miRNAs fueron comparados con los Ct provenientes de los análisis TLDA mediante un análisis de RQ  $\Delta\Delta$ ct. Los ensayos fueron normalizados usando los controles internos RNU44 y RNU48. Los resultados muestran que un miRNA evaluado mediante ambos métodos, mantiene en todos los casos la misma tendencia de expresión, lo cual valida los resultados obtenidos con TLDA (figura 16A).

Otra interrogante fue determinar si los 54 miRNAs modulados se expresaron de manera similar en las muestras analizadas, para ello realizamos una matriz con los valores de CT de estos miRNAs lo que nos permitió encontrar que algunos miRNAs, por ejemplo el miR-155 y el miR-7 exhiben un patrón irregular estando ausentes en al menos una de las nueve muestras analizadas. Este análisis de variabilidad mostró que de los 54 miRNAs modulados, un grupo de 19 miRNAs reprimidos y 4 sobreexpresados se modulan de manera constante en el total de las muestras analizadas. La figura 16B es la representación gráfica del número de miRNAs que se expresan de manera constante en las nueve muestras tumorales.

##### **5.- Blancos predichos y validados de los miRNAs del perfil de expresión.**

Existen diversos programas que pueden predecir los blancos potenciales de los miRNAs y cada una de ellas se basa en distintos algoritmos generando blancos muy variables. Por ejemplo el programa TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_50/](http://www.targetscan.org/vert_50/)) arroja 281 posibles blancos del mir-155,



**Figura 16. Validación de la expresión de los miRNAs obtenida mediante TLDA.** (A) Tasa de valor de cambio de miRNA modulados analizados por TLDA y sondas individuales. La figura muestra la tasa de valor de cambio obtenido por TLDA (barra blanca) y su correspondiente valor obtenido por RT-PCR con sondas TaqMan específicas (barras grises). Se observa la expresión de ocho miRNAs distintos evaluados por ambos métodos en la misma muestra. El análisis de expresión relativa  $\Delta\text{ct}$  se hizo utilizando los RNU-44 y RNU-48 como normalizadores. El valor de expresión es similar en ambos métodos lo cual valida la expresión obtenida con TLDA. B) Número de miRNAs con expresión constante en las muestras tumorales. La figura muestra la proporción de miRNAs que se expresan de manera constante en las 9 muestras tumorales. De los 20 miRNAs sobreexpresados sólo 4 se expresan en niveles similares en los 9 tumores, mientras que 19 de los 34 miRNAs reprimidos de manera constante en estas mismas muestras.

mientras que miRanda ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)) arroja 5,545. Esto se explica porque el algoritmo de miRanda es más flexible al simular el apareamiento de la región semilla del miRNA sin considerar la conservación de las regiones, mientras que TargetScan considera el contenido de uracilos y adeninas en la secuencia, así como la proximidad de clústers y la conservación de la secuencia en diversas especies animales. En este estudio realizamos la predicción de blancos con el software TargetScan y miRDataBase, este último para los blancos de los miRNAs “estrella”.

Los resultados muestran una gran variabilidad en el número de blancos predichos para cada miRNA, por ejemplo el miR-21 posee 210 blancos potenciales, mientras que para el miR-195 se estiman 968 blancos, en el caso del miR-100 sólo se predicen 40 blancos. La totalidad de los blancos predichos para cada uno de los miRNAs fue registrada en una hoja de cálculo obteniendo un total de 6837 blancos potenciales que pueden ser regulados por uno o más de los 54 miRNAs modulados.

En el caso de los blancos validados estos fueron obtenidos con el programa miRecords (<http://mirecords.bioclead.org/>). Esta base de datos considera como blancos validados solo aquellos genes que experimentalmente han sido analizados mediante estudios de interacción entre la región semilla y su respectivo blanco. Los resultados arrojados por el programa miRecords muestra que de los 54 miRNAs modulados sólo cuatro poseen blancos

validados. Estos son los miRNAs miR-21 con 42 blancos validados, miR-204 con 19, miR-155 con 26 y miR-10b con cuatro.

La tabla 9 es un ejemplo de algunos datos que fueron recopilados con estos programas y que nos permitieron crear una matriz con la totalidad de blancos predichos, misma que se tomo como base para realizar realizar los análisis posteriores.

## **6. Vías de señalización afectadas por los miRNAs modulados en cáncer de mama.**

Una parte importante de este proyecto fue conocer de que manera los miRNAs pueden estar participando dentro de los procesos oncogénicos. Una aproximación a esto es realizando un análisis de las funciones que de manera conjunta realizan la suma de los blancos predichos de todos los miRNAs modulados en los tumores analizados. Para ello, los 6837 blancos potenciales obtenidos anteriormente, fueron analizados mediante la base de datos David Ontology como se describe en la metodología. Los resultados sugieren que existe una modulación de importantes vías de señalización en el desarrollo de los procesos oncogénicos, regulados a través de los blancos potenciales de los 54 miRNAs.

**Tabla 9. Blancos predichos y validados de los miRNAs modulados en los tumores de pacientes mexicanas.**

microRNA	Blancos teóricos	Blancos validados
miR-944	7A5, ZBTB1, ZMYM6, C6orf190, AP1S3, PAP2D, HNF4G, PTPN20B, PTPN20A, KCNT2	_____
miR-18b	NEDD9, GLRB, INADL, PHC3, ESR1, KCNA1, TMEM170B, DICER1, HMGCS1, ATM	_____
miR-204	SLC37A3, SH3TC2, RAB22A, LYRM2, AP1S2, PHOX2B, SAMD5, ACSL4, NR3C1, B3GNT5T	SPDEF, CTSC, MMP3, MMP9, BMP1
miR-21	YOD1, GATAD2B, GPR64, BMPR2, PLAG1, RP2, KRIT1, SCML2, BRWD1, PIP5K3	TPM1, NFIB, PDCD4, SERPINB5, CDKN1A
miR-130b/301a	MIER1, SLAIN1, C10orf140, MYBL1, PAN3, MTMR9, CLIP1, DDX6, TSC1, ENPP5	_____
miR-155	IKIP, GABRA1, BACH1, JARID2, ZNF652, ZBTB38, RBAK, RAB11FIP2, KIAA1715, KIAA1333	AGTR1, BACH1, LDOC1, MATR3, TM6SF1
miR-10b	ARSJ, BDNF, SOBP, CRLF3, TFAP2C, FIGN, ELOVL2, HCN1, NCOR2, WNK3	HOXD10, KLF4, SFRS1, SFRS10
miR-142-3p	WASL, RHOBTB3, C10orf18, USP6NL, C20orf194, SLC37A3, PRLR, FAM44B, SLC35F5, ITGB8	_____
miR-142-5p	ITGAV, ZFPM2, FAM18B, FAM91A1, DIAPH2, BVES, MTMR10, OTUD4, ONECUT2, MKL2	_____

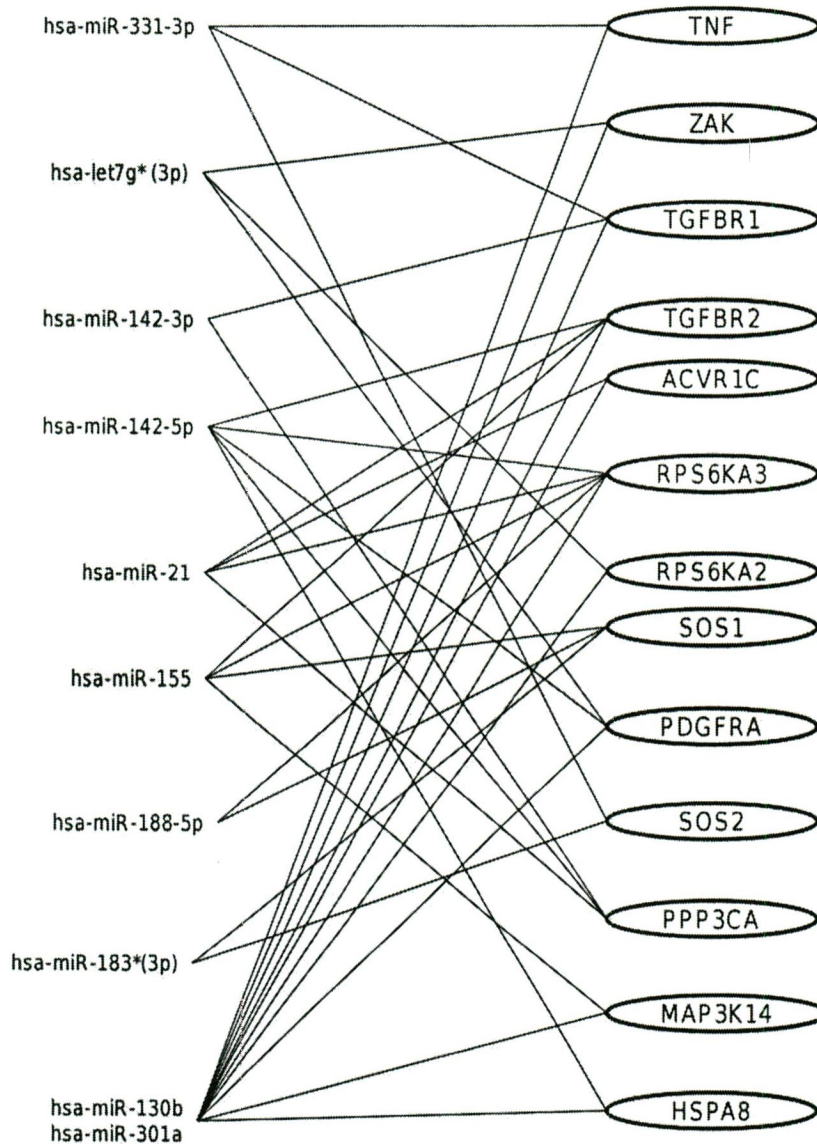
La tabla muestra los miRNAs que fueron modulados en los tumores mamarios, así como los primeros diez blancos predichos para cada miRNA (TargetScan) y los primeros cinco blancos validados de cada uno de ellos (miRecords). El anexo B incluye el listado completo de estos resultados para miR-944 y miR-18b.



Entre estas vías se encontraron MAPK con 114 blancos potenciales, adhesión focal con 90, WNT con 75, TGF- $\beta$  con 48 y Her2/ErbB con 47; esta última vía de señalización es correspondiente al receptor hormonal presente en los nueve tumores analizados en este proyecto. La tabla 10 resume los resultados de este análisis. Considerando que la vía de señalización de MAPK es la que tiene un mayor número de genes potencialmente regulados por los miRNAs que se modularon en nuestras muestras, se busco entre las proteínas que participan en esta vía, aquellas que pueden ser reguladas por más de 5 miRNAs sobreexpresados en en los tumores. De manera interesante, 10 miRNAs modulan de manera coordinada a 13 proteínas que participan en la vía de MAPK, lo que supone que para efectuar la regulación de esta vía de señalización, los miRNAs deben expresarse de manera conjunta (Fig. 14).

**Tabla 10. Vías de señalización potencialmente afectadas por los miRNAs desregulados en las biopsias analizadas.**

Vía de señalización (KEGG)	Número de genes	-ln (p-value)
MAPK	114	22.63
Adhesión focal	90	19.83
Wnt	75	22.37
Orientación del Axon	71	28.93
Proteólisis mediada por ubiquitinación	63	15.39
Cáncer colorectal	54	27.37
Cáncer de prostate	52	21.86
Uniones adherents	48	27.51
TGF-beta	48	15.61
ErbB	47	15.38



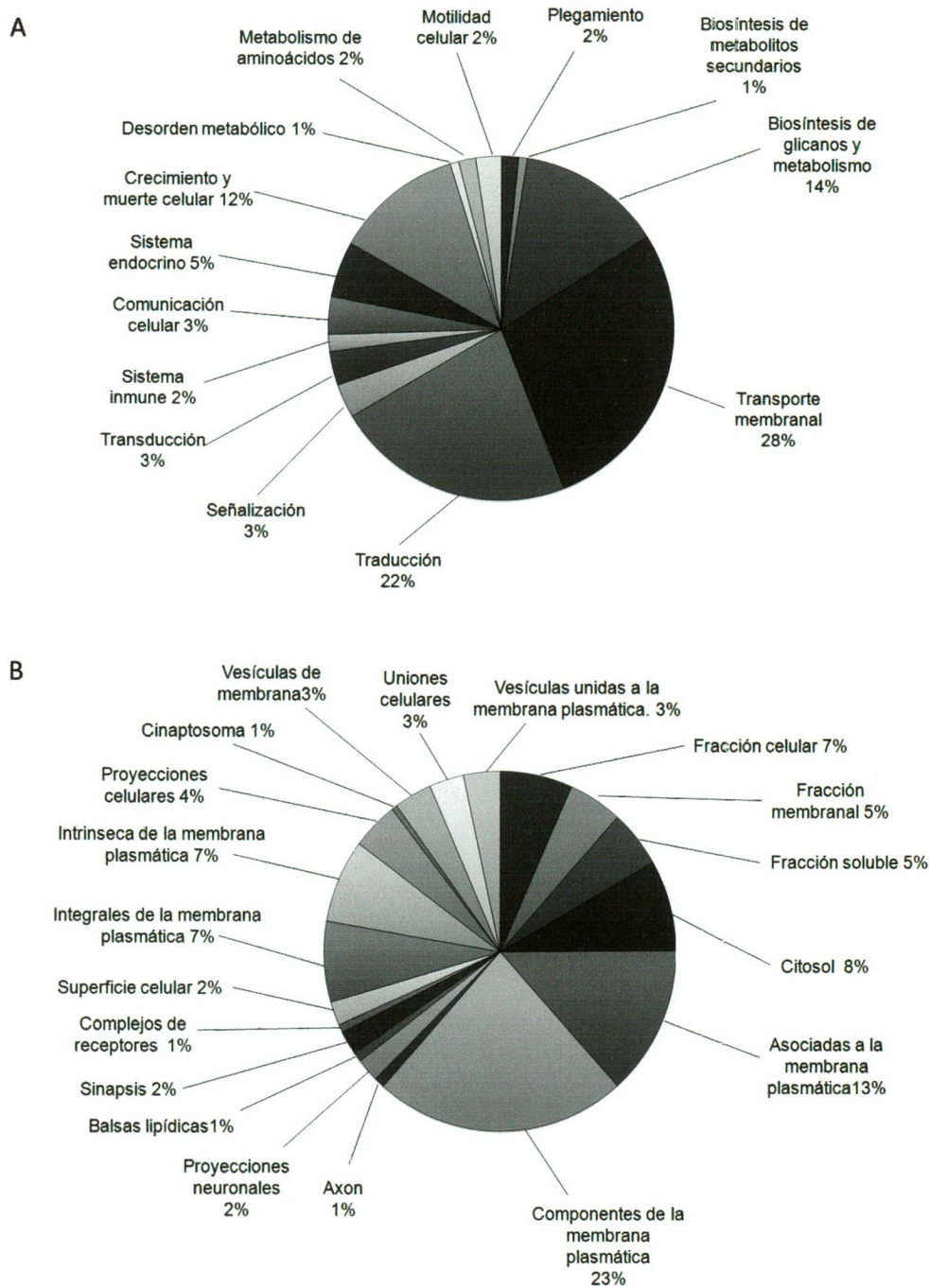
**Figura 17. Regulación coordinada de miRNAs sobre la vía de MAPK.** La figura muestra proteínas de la vía de señalización MAPK reguladas por algunos de los miRNAs modulados. Posterior al análisis en el programa DAVID Ontology, los resultados de las vías de señalización moduladas mostraron la ruta de MAPK cinasas como la principal vía afectada por los miRNAs modulados. Los genes de esta ruta fueron buscados en la matriz que contiene la totalidad de los blancos encontrando que varios de ellos pueden ser modulados por distintos miRNAs a la vez, lo que implicaría una regulación conjunta de estos miRNAs sobre la vía. Los ovalos del lado izquierdo representan proteínas pertenecientes a la vía de señalización MAPK, las líneas unen a estas con miRNAs que regulan a su vez otras proteínas de la misma ruta.

## 7. Análisis de enriquecimiento y ontogenia de los blancos predichos de los miRNAs modulados en los tumores mamarios.

Otro método para determinar de forma aproximada las funciones de los miRNAs en la biología tumoral consiste en realizar un análisis de enriquecimiento y ontología de los blancos predichos de los miRNAs modulados. El enriquecimiento consiste en determinar el porcentaje de genes que pertenecen a una categoría de ontología. La ontología de genes (GO) es la anotación de genes más aceptada y utilizada alrededor del mundo. Consiste en la generación de vocabularios estructurados con fines de simplificación y estandarización de términos entre las distintas bases de datos. Este tipo de análisis nos permite determinar los procesos biológicos, la función molecular y la distribución celular que poseen los blancos predichos de los miRNAs modulados en nuestras muestras tumorales. El proceso biológico implica genes que generalmente participan en transformaciones químicas o físicas y pueden pertenecer a un nivel de agrupamiento elevado y menos específico con procesos como el “crecimiento celular” o la “transducción de señales”, o de un nivel menor o más específico como son el “metabolismo de pirimidinas” o la “biosíntesis de AMPc”. Por otra parte la función molecular, se refiere actividades sin especificar cuándo, dónde, o en qué contexto ocurren: “Factor de transcripción” y “Helicasa” son ejemplos. Para evitar confusiones entre los nombres de los productos génicos y las funciones moleculares, muchos términos incorporan la palabra “actividad”. El componente celular, se refiere al espacio celular donde se encuentra el producto génico y puede ser una

estructura anatómica, como el retículo endoplasmático, el núcleo celular, un ribosoma o un dímero proteico.

El análisis de enriquecimiento se realizó de igual manera que el anterior con referencia en los 6837 blancos predichos obtenidos con la base de datos Target Scan y miRDataBase. La lista fue ingresada a la base de datos DAVID y se obtuvo el proceso biológico, la función celular, así como la distribución celular asociada a cada blanco predicho. De manera sorprendente la mayoría de los blancos predichos participan en el transporte de moléculas, seguido de la traducción (transporte membranal 28%, traducción 22%) seguida del metabolismo y biosíntesis de glicanos (14%). El resto se distribuye en distintas funciones moleculares destacando el crecimiento y la muerte celular (12%). En cuanto a la distribución celular la mayor parte de los blancos predichos se encuentran (23%) o forman parte integral de la membrana plasmática (13%), contra un 8% que se localiza en el citosol, lo cual sugiere que los miRNAs pueden regular los procesos en los que participan desde elementos celulares situados en la membrana celular así como las vías de señalización de MAPK. El resto de blancos predichos se asocia de manera homogénea con diversas estructuras celulares. Los resultados fueron resumidos gráficamente y expresados en porcentaje en la figura 18. La tabla 1 incluye los datos ampliados de este análisis.



**Figura 18. Análisis de enriquecimiento y ontología de los blancos predichos para los miRNAs modulados.** A) El gráfico muestra en porcentajes la distribución de las funciones celulares que se asocia a los blancos predichos para los miRNAs modulados en nuestras muestras tumorales. B) El gráfico muestra en porcentajes, la distribución celular de los blancos predichos para los miRNAs modulados.

**Tabla 11. Análisis de enriquecimiento y ontología de los blancos potenciales de los miRNAs modulados en el perfil.**

**Procesos Biológicos:**

Proceso Biológico (GO:Clave)	GENES	Porcentaje	p-value
GO:0045449~regulation of transcription	454	20.9796673	2.28E-19
GO:0045449~regulation of transcription	422	19.618782	8.20E-13
GO:0006350~transcription	377	17.4214418	9.53E-18
GO:0006350~transcription	324	15.0627615	2.69E-07
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	318	14.6950092	4.00E-13
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	311	14.3715342	8.02E-13
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	292	13.5750814	2.07E-08
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	283	13.1566713	9.10E-08
GO:0007242~intracellular signaling cascade	208	9.66992097	4.95E-07
GO:0007242~intracellular signaling cascade	203	9.38077634	7.56E-06
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	181	8.36414048	1.66E-14
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	162	7.48613678	3.91E-15
GO:0008104~protein localization	153	7.0702403	2.65E-06
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	148	6.83918669	3.05E-12
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	147	6.79297597	1.97E-12
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	146	6.74676525	2.49E-14
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	145	6.70055453	3.77E-15
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	144	6.65434381	4.29E-13
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	143	6.64807067	2.71E-05
GO:0008104~protein localization	142	6.60158066	3.43E-05

**Función Molecular:**

Función Molecular (GO:Clave)	GENES	Porcentaje	p-value
GO:0045449~regulation of transcription	422	19.618782	8.20E-13
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	136	6.32264063	2.99E-10
GO:0006796~phosphate metabolic process	180	8.36820084	1.11E-09
GO:0006793~phosphorus metabolic process	180	8.36820084	1.11E-09
GO:0016055~Wnt receptor signaling pathway	41	1.90609019	1.83E-08
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	292	13.5750814	2.07E-08
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	78	3.62622036	2.29E-08
GO:0016310~phosphorylation	148	6.88052069	4.28E-08
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	283	13.1566713	9.10E-08
GO:0006350~transcription	324	15.0627615	2.69E-07
GO:0048598~embryonic morphogenesis	69	3.20781032	2.91E-07
GO:0007242~intracellular signaling cascade	208	9.66992097	4.95E-07

## Resultados

GO:0042127~regulation of cell proliferation	141	6.55509066	6.50E-07
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	54	2.51046025	7.08E-07
GO:0001944~vasculature development	58	2.69642027	1.14E-06
GO:0001568~blood vessel development	56	2.60344026	2.54E-06
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	92	4.27708043	5.19E-06
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	71	3.30079033	5.64E-06
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	91	4.23059042	6.56E-06

### Componente Celular:

Componente Celular (GO:Clave)	GENES	Porcentaje	p-value
GO:0044451~nucleoplasm part	108	4.99075786	2.64E-09
GO:0031981~nuclear lumen	226	10.4436229	1.22E-08
GO:0005654~nucleoplasm	142	6.56192237	1.73E-06
GO:0005794~Golgi apparatus	140	6.46950092	2.45E-06
GO:0016585~chromatin remodeling complex	23	1.06284658	4.04E-06
GO:0043005~neuron projection	66	3.04990758	6.12E-06
GO:0042995~cell projection	115	5.3142329	6.19E-06
GO:0031410~cytoplasmic vesicle	106	4.89833641	1.49E-05
GO:0043233~organelle lumen	252	11.6451017	3.13E-05
GO:0070013~intracellular organelle lumen	247	11.4140481	3.31E-05
GO:0031982~vesicle	108	4.99075786	3.45E-05
GO:0016023~cytoplasmic membrane-bounded vesicle	92	4.25138632	3.50E-05
GO:0045202~synapse	65	3.00369686	4.00E-05
GO:0044459~plasma membrane part	297	13.7245841	4.25E-05
GO:0031988~membrane-bounded vesicle	94	4.34380776	4.36E-05
GO:0031974~membrane-enclosed lumen	255	11.7837338	4.88E-05
GO:0030424~axon	35	1.61737523	9.64E-05
GO:0016607~nuclear speck	26	1.20147874	9.68E-05
GO:0016604~nuclear body	36	1.66358595	1.33E-04



## 8. miRNAs con funciones no conocidas en cáncer de mama.

Cabe destacar que de los 54 miRNAs modulados, 32 de ellos no han sido reportados previamente dentro del cáncer de mama aunque sí en otros tipos de cáncer. Entre estos 32 miRNAs, 11 de ellos no han sido reportados en ningún tipo de cáncer. La relevancia de estos miRNAs radica en la potencialidad de regular procesos fundamentales en la oncogénesis.

En la tabla 12 apreciamos los diversos miRNAs que han sido reportado o validados en otro tipo de tumores así como así como aquellos que no tienen algún blanco conocido. En el caso de los miRNAs miR-139-3p, miR-125b-2\*, miR-486-5p, miR-541, miR-1, miR-132\*, miR-944, miR-424\*, miR-508-3p, let7c, miR-656, miR-543 y miR-181a\*; son genes que carecen de reportes previos en algún tipo de cáncer, por lo que además de ser novedosos es importante elucidar que participación tienen dentro del desarrollo del cáncer. Para ello es importante considerar que las herramientas de predicción de blancos potenciales nos brindan datos importantes al sugerir la posible función de cada uno de estos miRNAs. Basados en la herramienta TargetScan V 5.2 que busca dentro de las secuencias 3'UTR de los genes humanos una posible interacción con la región semilla de los miRNAs, es posible obtener los blancos potenciales de un miRNA, por ejemplo, el miR-944, no reportado previamente y que tiene la potencialidad de regular 531 genes.

**Tabla 12. miRNAs modulados en tumores mamarios con funciones no descritas previamente en cáncer de mama**

Reprimidos	Blancos validados en otros cancer	Nombre (UniProtKB <sup>b</sup> )	Referencia
hsa-miR-139-3p	-		
hsa-miR-125b-2*	-		
hsa-miR-486-5p	-		
hsa-miR-541	-		
hsa-miR-216b	KRAS CKIIα	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog Casein kinase II subunit alpha	140 141
hsa-miR-489	PTPN11 DEK	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 DEK oncogene	142 143
hsa-miR-1	-		
hsa-miR-376c	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	144
hsa-miR-132*	-		
hsa-miR-132	FOXO3, TLN2, HBEGF, RB1, MECP2, JARID1A, BTG2, PAIP2a EP300	Forkhead box O3 Talin 2 Heparin-binding EGF-like growth factor Retinoblastoma 1 Methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome) Jumonji, AT rich interactive domain 1A BTG family, member 2 Poly(A) binding protein interacting protein 2 E1A binding protein p300	145   146 147  148
hsa-miR-369-3p			
hsa-miR-944	-		
hsa-miR-424*	-		
hsa-miR-508-3p	-		
hsa-miR-337-3p	STAT3 RAP1A	Signal transducer and activator of transcription 3 RAP1A, member of RAS oncogene family	149
hsa-let7c	-		
hsa-miR-376a	IGFR1 PIK3R1 CDK2 AGO2	Insulin-like growth factor 1 receptor Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 Cyclin-dependent kinase 2 Argonaute 2	150 151  152
hsa-miR-656	-		
hsa-miR-543	-		
hsa-miR-95	SNX1	Sorting nexin 1	153
Sobreexpresados	Blancos validados en otros cancer	Nombre (UniProtKB <sup>b</sup> )	Referencia
hsa-miR-638	BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	154
hsa-miR-130b	TP53IN1 CSF1 ZEB1 NR3C1	Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 Colony stimulating factor 1 (macrophage) Zinc finger E-box binding homeobox 1 Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	155 156 157 158

## Resultados

	CCN3	CCN family member 3	159
hsa-miR-142-3p	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	160
	cAMP/PKA		161
	GR $\alpha$		162
	CCNT2	Cyclin T2	
	TAB2		
	IL6	Interleukin 6	
hsa-miR-708	EYA3	Eyes absent homolog 3 (Drosophila)	163
	CD44	CD44 molecule	164
	AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	165
	ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2	
hsa-miR-181a*			
hsa-miR-18b	ER $\alpha$	Estrogen receptor $\alpha$	166
	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	167
	NEDD9	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	
	MEKK1		
hsa-miR-142-5p	-		
hsa-miR-431	VCAN	Versican	168
hsa-miR-301a	BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death	169
	NKRF	NF- $\kappa$ B repressing factor	170
	PAI	Plasminogen activator inhibitor 1	
	PIAS2	Protein inhibitor of activated STAT, 2	
hsa-miR-188-5p	-		
hsa-miR-331-3p	DOHH	Deoxyhypusine hydroxylase	171
	KLK4	Kallikrein-related peptidase	172
	ERRB2	Human epidermal growth factor receptor 2	173
	E2F1	Transcription factor E2F1	174

<sup>a</sup>Simbolo del gen. <sup>b</sup>Nombre recomendado de la proteína (UniProtKB)

Al considerar todos los blancos predichos y realizando un análisis de enriquecimiento con la base de datos DAVID ontology, fue posible observar que dentro de este listado de blancos potenciales algunos de ellos se agrupan dentro de importantes vías de señalización tales como WTN, TGF- $\beta$  y ErRb. Incluso al analizar de manera individual la función de cada uno de estos potenciales blancos encontramos que existe un grupo de genes que participan en los procesos de migración, invasión y metástasis como PRKCA, BRIP1, PAK1, MTDH, etc.

Por otra parte, un grupo de miRNAs que encontramos modulados, no ha sido caracterizado en cáncer de mama pero sí en otros tipos de cáncer, además de tener blancos validados. Esto nos permite suponer que en el contexto de cáncer de mama su función puede ser similar a la reportada en otros tipos de cáncer. Ejemplo de esto es el miR-376a, el cual ha sido descrito en hepatomas, donde regula genes como IGFR1, PIK3R1, CDK2 y AGO2. En esta clase de tumores este miRNA se encuentra apagado y su expresión inhibe la proliferación e induce apoptosis<sup>139</sup>. Dado que la expresión de este miRNA, es reprimida en nuestros análisis y en tumores hepáticos, es posible suponer que la función de este miRNA en el contexto del cáncer de mama es similar a los hepatomas.

## 9. Selección de miRNAs para su estudio funcional.

Los resultados obtenidos previamente mostraron la existencia de 54 miRNAs modulados de manera diferencial en nuestras muestras. Para determinar cuáles de ellos podrían estudiarse funcionalmente se utilizaron tres criterios de selección. El primero de ellos fue la expresión constante de los miRNAs en las nueve muestras analizadas. Para ello se promedió el valor de Ct de las nueve muestras y se obtuvo la desviación estándar; por ejemplo; el miRNA 155 ( $p\text{-value} < 0.05$  fold change  $> 2$ ) tiene un valor un valor de Ct variable en las muestras (desviación estándar = 7.53), mientras que el miR-944 presenta un valor de Ct más constante en nuestras muestra (desviación estándar = 0.98), por lo que el primero ya no se consideró para continuar con su estudio. El segundo criterio fue la información existente de cada miRNA, por ejemplo; en el caso del miR-21 ya ha sido ampliamente estudiado en cáncer de mama, mientras que del miR-188-5p no existe ningún reporte en la base de datos del Pubmed por lo que sería importante estudiarlo para aportar nueva información sobre este miRNA. Los miRNAs que seleccionamos no han sido reportados previamente en algún tipo de cáncer o se desconoce su función en cáncer de mama. El tercer criterio fue considerar las rutas de señalización que potencialmente puede regular cada microRNA, por ejemplo el miR-142-3p tuvo una expresión relativamente constante en los tumores analizados y no ha sido reportado previamente en cáncer de mama. Sin embargo al considerar las rutas de señalización en las que están implicados sus blancos celulares tales como regulación del citoesqueleto de actina, uniones estrechas, interacción con

la matriz extracelular y señalización de la vía del calcio, resultaría más interesante estudiar algunos miRNAs como el miR-130b, el cual tiene las mismas consideraciones que el miRNA anteriormente mencionado pero que además puede modular vías tradicionalmente asociadas al desarrollo del cáncer tales como TGF- $\beta$ , mTOR, uniones adherentes y cáncer colorectal. Finalmente considerando estos criterios, se seleccionaron los miRNAs miR-944 y miR-18b para sus análisis funcionales.

Acorde al programa TargetScan V5.2, el miR-944 puede regular de manera potencial la expresión de 531 genes, entre ellos destacan algunos como PRKC $\alpha$ , COL4A4, FZD8, CTBP1, CDK6, APPL1, WNT1, IGF1R, CUL2, MAPK1, CBLB, CDKN2B, SOS1, VEGFA, AXIN2, APC que acorde a KEGG son genes que participan en el desarrollo del cáncer (hsa05200: Vías en cáncer). Hasta el momento este miRNA no ha sido reportado en cáncer de mama y en los nueve tumores analizados por TLDA, este miRNA mostro una represión constante con una Ct promedio de 12.9 y una desviación estándar en sus valores de Ct de 0.98. Entre las rutas que este miRNA puede regular potencialmente se encuentran; Wnt, TGF- $\beta$ , GnRH, calcio y MAPK, así como como proteínas asociada a glioma, cáncer colorectal, renal, leucemia y procesos como la proteólisis, el transporte vesicular y la adhesión focal.

El otro miRNA seleccionado fue el miR-18b, el cual se encontró sobreexpresado en los nueve tumores analizados con TLDA, mostrando una Ct

promedio de 14.2 y una desviación estándar de 1.22. Este miRNA tiene 189 blancos potenciales entre los cuales destacan los genes relacionados con cáncer CDC42, HIF1A, PIAS3, IGF1, SMAD2, KIT, RUNX1, STK4, CDK2 (KEGG hsa05200: Vías en cáncer). Las vías de señalización que este miRNA puede regular potencialmente son; endocitosis, p53, uniones estrechas y la proteólisis mediada por ubiquitinas. Este miRNA ya ha sido descrito en distintos tipos de cáncer incluido cáncer de mama y ha sido asociado a los procesos de migración e invasión <sup>167, 217</sup>.

A continuación se enlistan los blancos predichos para el miR-944 así como su secuencia génica.

**Blancos predichos del miR-944 (TargetScan)**

TA5	LRP2	SPAST	DCX	AKAP2	RAD23B	CXorf1	HCN4
ZBTB1	C1orf21	PCLO	MGA	CHD9	STARD13	SLMAP	HELZ
ZMYM6	ZDBF2	TMEM106B	SLC12A1	PALM2-	MEX3A	RGS14	C1orf146
C6orf190	AKAP11	LRRTM2	RALGPS1	AKAP2	NPEPPS	DIS3	TLL2
AP1S3	MOBK13	GPR88	SLC12A2	PPARGC1A	MIER3	OTOA	BHLHB3
PAP2D	C3orf15	TXNDC10	TBR1	SNX10	AEBP2	KIAA1462	ZBTB38
HNF4G	GABRB2	IGF1R	CUL3	YAF2	PTPRB	HNRNPA2B1	UPP2
PTPN20B	ZDHHC17	APPL1	TRPS1	KTELC1	NKD1	KIAA0256	CDK6
PTPN20A	SLC4A7	NEUROD1	ACTR1B	APC	TAF4B	GAL3ST3	ELAVL1
KCNT2	VGLL3	SC5DL	HMGB1	NUP153	TSC22D4	MED17	PRKCH
HRH4	TCHHL1	OTUD6B	BRWD1	SV2B	LSM12	FBXO8	C11orf45
MRPL42	KAT2B	DCUN1D4	ZNF507	SHANK3	HOXB5	GABARAPL2	BET1
CREB5	TMEM26	GYPA	SPIN1	C1orf173	CYBRD1	ERG	C11orf58
DICER1	IKZF2	TSC22D2	DPYSL2	C5orf28	CPEB2	AKAP5	MREG
EPC2	UBL3	ADAMTS5	SNX18	ADH5	GATA6	ODZ1	AADAACL1
JRKL	GPR155	CCDC15	BMPR2	MRPL45	SASH1	ENAH	PRKCE
PAK2	GRM7	MYLK3	BTBD3	PTP4A1	AIDA	RHOBTB3	BNIP3
PDLIM5	SGCB	CREG1	HIGD1A	EYA4	EXT1	DLGAP2	CXorf41
ZPLD1	STAM2	UBE2K	LRCH2	RFX4	METT5D1	SS18L2	C9orf150
SOCS4	B3GNT5	DIO2	PEL12	NF1	KLF12	SMC5	CHMP7
GLT8D3	CHM	PRDM1	SCD	BDNF	ABCB10	PSCD1	ERMN
AHCTF1	SP5	IL22	ARHGAP20	WAPAL	SEMA3A	RAPGEF2	TSHZ1
AP4E1	CPEB4	KIAA2018	MBTD1	PDSS2	LINGO1	CISH	BAT5
SSPN	EXOC5	CCDC58	ZNF536	FOXN3	KIAA0247	SPOP	SOS1
FBN1	TMEM65	CALML4	SR140	ZFYVE16	SEC24A	VAMP4	PITPNB
ACVR2B	PRRX1	GPAM	PJA2	LOC153364	MEGF10	SLC35A5	SLC38A1
NIN	ZDHHC21	TMEM182	NEXN	MAPK1IP1L	PTPN9	SLC44A1	PRDM8

## Resultados

BBS9	IFT80	C3orf60	RICH2	KIF1A	NECAB3
SAR1B	AREG	CBLB	NLK	ASPRV1	PPP1CB
LPIN2	PURB	SORBS1	KRIT1	PLXNA4	BACH2
KIAA1549	PBX3	DIP2B	DCLK2	APAF1	KIAA1486
LIG1	SETD5	SP8	KIAA0644	LOC402176	NTRK2
SNX14	CALB1	FHDC1	DNAJC12	PRDM16	MBNL1
SUSD5	EPB41L1	GATA2	RBM27	D4S234E	UBTD2
PRKCA	CCL8	MID1	SLCO4C1	RPGRIP1L	TFAP2B
UBR1	ITPR2	KIAA1543	SH3GLB1	NIPBL	CNGB3
JARID1B	DPP9	ST18	ATP1B1	ZBTB40	PPP1R16B
PTPN11	STK24	LRP1	SAMD12	ZFHx4	EPHA8
ALS2CR4	PRICKLE2	CDCP1	KLF4	SPATS2	WAC
RAB22A	FLJ44838	PTGER3	HECW2	DYRK1A	TAOK1
CTCF	CEP135	ZNF750	MCL1	DZIP3	
AXIN2	MME	C2orf55	SP7	NEO1	
SORCS3	PDS5A	GPR180	FEM1C	DUSP5	
C17orf39	SNX27	NPAS3	CA7	FBXO4	
PNPLA8	STXBP1	SGCD	MLL	TFRC	
DCUN1D3	PAPPA	ING2	OPCML	CD83	
RP11-	PDE7A	ATN1	ALS2CR13	SHANK2	
68118.1	EPB41L4B	MAPK1	ATP6V0A2	NCOA1	
NCOA2	KHDRBS2	SIAH1	CCDC4	GJC1	
NEGR1	TLR4	VEZF1	RAPGEF5	ARHGAP26	
EDEM3	GRM8	MTPN	CYYR1	CSMD1	
C18orf34	HNRPDL	DLG2	CYR61	SEMA5A	
CNTD1	OSBP	C6orf165	NR3C2	GRIA4	
TMEM135	ZNF713	C18orf25	ST3GAL2	CASK	
RERE	MTDH	GAS6	GDF6	ARID4B	
RSU1	COL1A1	PHACTR4	DCTD	HIVEP1	
VPS13C	UVRAG	HIRA	WNT1	SCRT2	
ABCF2	FAT3	ZDHHC5	MEF2D	COL4A4	
ETV6	JAG1	DLL4	PATZ1	GLIS3	
ORMDL1	LY75	NHLH2	ZNF276	PUM1	
NEFM	USP6	BCAT1	AKAP6	PRRG3	
PDPK1	REV1	ADAMTSL1	HLTF	RCOR1	
RABGEF1	ESRRG	FDX1	TMEM63B	ZMYND11	
STEAP2	EIF4G2	C14orf101	INTS2	SEMA6A	
TAC1	CAMK2G	TCF3	TMEM184A	KIAA0564	
GUF1	SRrp35	FZD8	TRPC1	MEGF9	
ACSL4	JHDM1D	CTBP1	GABARAPL1	GRAMD4	
CDC14B	INPP5A	GMPPB	SLC4A2	CD72	
GLO1	PPP3CA	TCHH	RND2	ZNF385D	
STX2	BRIP1	ZNF608	VTI1A	ST8SIA2	
SIX4	PHF16	RMND5A	USP31	EHF	
XPO4	CUL2	C9orf68	VEGFA	RP5-	
SATB1	SLC12A5	FANCE	TOB2	1022P6.2	
ZNF236	CYLD	ADCY1	SMU1	DGKB	
UNC45B	LPHN2	C21orf91	PHF19	C5orf13	
TMEM32	tcag7.1228	BRCA1	MATN3	RAB6B	
TRIM32	POR	MMP14	C20orf12	ADO	
USP34	C4orf43	FRS3	KIAA1853	MAF	
ELAVL3	ADARB1	PNRC1	FLJ35776	PUM2	
ATP2B1	AMOT	ATP2B2	PKN2	CDKN2B	
BCL11B	GAS1	CCM2	ANTXR2	GRID1	
C18orf62	THBS1	PRELID2	KIAA1012	UBE2G1	
FOXP1	GNAO1	LRIT3	KLF15	TBL1XR1	
MAP4K3	TMEM50B	METTL8	HOOK3	UBXD7	
GOLGA2	LOC202459	TLK2	VAMP7	VAMP2	
HS3ST3B1	INHBB	ATXN7L1	PLEKHG3	ZNF516	
SNX9	HMG2L1	MAFB	SPTLC1	HIPK2	
BCL2L2	ARL15	EN2	BCL11A	HUNK	



**Sin blancos validados (miRecords)****Secuencia del miR-944**

>hsa-mir-944 MI0005769 (miRBase)

```
GUUCCAGACACAUCUCAUCUGAUUACAAUAUUUUCUAAAUUGUAUAAAGAGAAAUAU
UGUACAUCGGAUGAGCUGUGUCUGGGAU
```

**Stem-loop**

```

          u          a          u          aaauu
guuccagacaca cucaucugau uacaaua uuucuu      g
|||||          |||||          |||||          |||||
uagggucugugu gaguaggcua auguuau aaagag      u
          c          c          u          aaaua

```

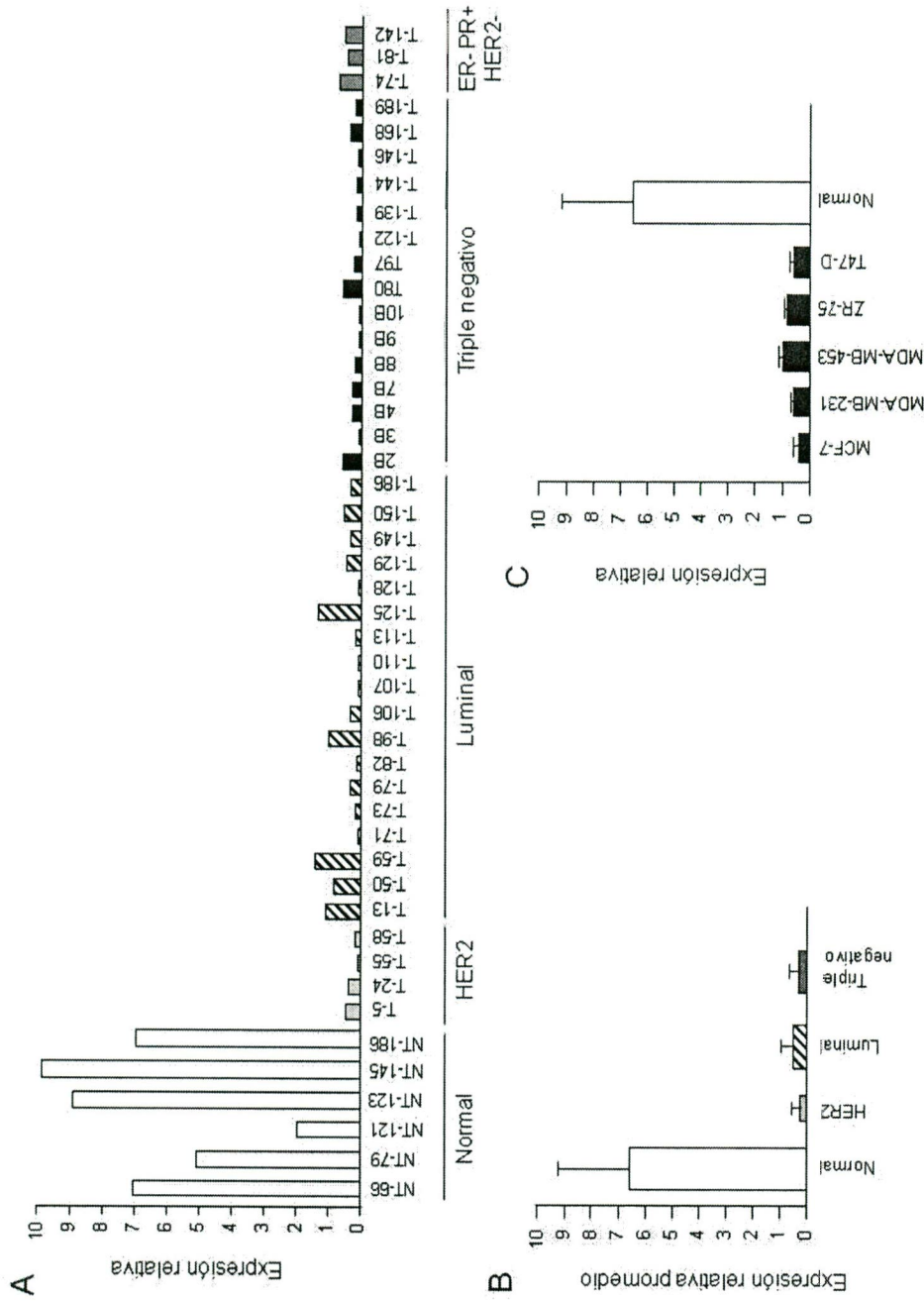
## 10. La expresión del miR-944 es suprimida en tumores y líneas celulares de cáncer de mama.

La expresión del miR-944 fue evaluada en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75 y T47D mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron que los niveles de expresión del miR-944 en las fueron disminuidos (9 a 15 veces) en células MCF-7, MDA-MBD-231, MDA-MB-45, ZR-45 y T47-D en comparación con la expresión observada en los tejidos mamarios normales (Figura 19 A). Para determinar la relevancia clínica del miR-944, evaluamos su expresión a través de RT-PCR en 40 pacientes con cáncer de mama y seis tejidos normales. Los tumores fueron estratificados de acuerdo a la expresión del receptor de estrógenos, progesterona, her2+ y triple negativo (Figura 19B). Los resultados muestran que el miR-944 se encuentra reprimido en los subtipos tumorales Her2, luminal, triple negativo y RE-, Her2-, RP+ en

comparación con los tejidos mamarios normales, confirmando así los resultados del TLDA. No se encontró relación entre la expresión del miR-944 y alguna otra característica clínica como edad, subtipo histológico o grado tumoral.

### **11. La expresión del miR-944 no afecta la viabilidad celular.**

Con el fin de establecer cual es la participación del miR-944 en el cáncer de mama se realizaron diversos análisis funcionales, siendo el primero de ellos la evaluación del efecto de la expresión del miR-944 sobre la viabilidad celular. Para ello el pre-miR-944 fue transfectado a una concentración de 5- 200 nM en las células MCF-7 y MDA-MB-231. Se utilizó como control la viabilidad de células sin transfectar, además de evaluar la misma en células expuestas al agente transfectante y con una molécula scramble. La viabilidad fue evaluada mediante ensayos MTT acorde a lo descrito en metodología. El valor de absorbancia encontrado en el grupo control (células sin transfectar) fue considerado como el 100% de viabilidad. Observamos que ninguno de los controles internos (scramble y células con el agente transfectante) presentó cambios significativos en la viabilidad celular respecto al control. De la misma manera los resultados indican que la expresión del miR-944 no tuvo efecto sobre la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones analizadas.



**Figura 19. Expresión del miR-944 en líneas celulares de cáncer de mama y biopsias tumorales.** La figura muestra la expresión en la expresión del miR-944 en biopsias y líneas celulares mamarias. La expresión del miR-944 en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB453, ZR-75 y T47D y de 40 tumores mamarios, así como de tejido mamario normal fue analizado mediante RT-PCR, los valores fueron normalizados con base a la expresión de los RNU-44 y RNU-48. (A) Expresión del miR-944 en tumores mamarios y tejido mamario normal. (B) Representación gráfica del promedio de la expresión relativa de los tumores en A. (C) Comparativo de la expresión de la expresión del miR-944 en las líneas celulares mamarias y el tejido mamario normal.

## **12. Búsqueda de transcritos regulados por el miR-944 mediante microarreglos de expresión.**

El gen del mir-944 se localiza en el locus 3q28, dentro del gen de la proteína p63 la cual es miembro de la familia p53. De forma interesante, la expresión del miR-944 ha sido reportada en otros tipos tumorales. En cáncer de vejiga el miR-944 se asocia a una mejor respuesta al tratamiento así como a una mayor supervivencia <sup>303, 306</sup>, en cáncer colorectal su expresión se asocio a una menor recurrencia de la enfermedad <sup>304</sup>, en cáncer pancreático es descrito como un miRNA capaz de predecir la supervivencia de los pacientes <sup>305</sup>, mientras que en cáncer cervical su expresión es elevada respecto al control <sup>302</sup>.

Una herramienta que nos permite conceptualizar la función de los miRNAs, son los arreglos de expresión génica. A través de ellos es posible visualizar los cambios en la expresión génica causados por la inserción o inhibición de un miRNA. Dichos cambios pueden ser diversos y reflejarse en un grupo pequeño o amplio de genes, los cuales pueden a su vez estar regulados por el miRNA en cuestión o bien regulados de manera indirecta por los mecanismos celulares encendidos o apagados por los miRNAs. Para identificar los genes modulados que pudieran representar los posibles blancos del miR-944, analizamos los efectos de la restauración de este miRNA en la expresión génica. Para ello se realizó la hibridación del RNA total proveniente de la línea celular MDA-MB-231 transfectada con el precursor (50 nM) y sin transfectar en microarreglos de expresión. Los resultados muestran que de las 50400 sondas

contenidas en este microarreglo, 1342 genes mostraron una modulación en su expresión (1197 genes fueron reprimidos y 144 genes sobreexpresados) en comparación con las células sin transfectar ( $FC \pm 2.0$ ). La disminución en un número importante de genes es acorde con la inserción de un regulador negativo de la expresión génica. Al realizar un análisis de enriquecimiento con DAVID Ontology los resultados mostraron de manera interesante que 1342 genes modulados por el miR944 se agrupan en las categorías de vías metabólicas (33%), genes en cáncer (9%), regulación del citoesqueleto (8%), adhesión focal (8%), ciclo celular (5%), MAPK cinasas (6%), jak-stat (5%), p53 (3%), entre otras. Como podemos apreciar, el miR-944 impacta de manera importante en procesos que son clave en cáncer. Estudios adicionales nos permitirán definir si la regulación en cada uno de estos procesos es un mecanismo directo o indirecto regulado por este miRNA. La tabla 14 muestra los genes modulados en las células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944.

En una aproximación más directa que nos permita elucidar cuáles de estos genes podrían ser regulados por el miR-944, se realizó una búsqueda de sus blancos predichos en el programa TargetScan. Los resultados muestran 531 posibles blancos para el miR-944 los cuales fueron contrastados con los genes reprimidos en respuesta a la expresión de este mismo miRNA encontrados en el microarreglo. De manera interesante, un grupo de blancos reprimidos por el efecto de la inserción del pre-miR-944 llamaron nuestra

atención ya que poseen sitios potenciales de unión al miR-944 y han sido caracterizados dentro del cáncer de mama asociados a la regulación de eventos tales como ciclo celular (E2F3, LATS2, MAD1L1, NEK2, NIPBL, CCNE2, MAPK1, CHEK2, PTP4A1, RBL2), división celular (LATS2, MAD1L1, NEK2, CCNE2), supresión de tumores (BAX, LATS2, BRCA2, DLEC1, RBL2) y crecimiento tumoral (MAPK1, CAMK2G, FGFR2, GREB1, PBX1) entre otras. Sorpresivamente, 13 genes modulados tienen un papel clave en la invasión y migración celular. Estos genes son PAK1, PRKCA, CDCP1, NCOA4, ADAM28, PTP4A1, MMP14, FGFR2, TRIM32, ANXA7, DEK, NEK2 y NOTCH2, proteínas las cuales poseen sitios potenciales de unión al miR-944 (tabla 14).

**Tabla 13. Genes modulados (FC  $\pm$  1.5) en células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944.**

Simbolo	Nombre	Fold change
KRT4	keratin 4	-3.44
GABPA	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	-3.43
SH2D1B	SH2 domain containing 1B	-3.42
NEBL	Nebulette	-3.42
LOC440981	similar to hCG1794790	-3.42
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	-3.42
OR8H3	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3	-3.42
SCIN	Scinderin	-3.41
HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bi; histone cluster 1, H2bg; histone cluster 1, H2be; histone cluster 1, H2bf; histone cluster 1, H2bc	-3.41
NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	-3.41
IK	similar to CG18005; IK cytokine, down-regulator of HLA II	-3.41
SPAST	Spastin	-3.41
ADCY1	adenylate cyclase 1 (brain)	-3.40
SCGB1D2	secretoglobin, family 1D, member 2	-3.40
FEM1A	fem-1 homolog a (C. elegans); similar to fem-1 homolog a (C.elegans); similar to fem-1 homolog a	-3.40
MORF4L1	mortality factor 4; mortality factor 4 like 1	-3.40
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	-3.39
BTN2A1	butyrophilin, subfamily 2, member A1	-3.39
MTL5	metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin)	-3.39
TAGAP	T-cell activation RhoGTPase activating protein	-3.38
C9orf102	chromosome 9 open reading frame 102	-3.38
DSCR4	Down syndrome critical region gene 4	-3.38
OR4C12	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 12	-3.37
DCHS1	dachsous 1 (Drosophila)	-3.36
SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)	-3.36
C18orf26	chromosome 18 open reading frame 26	-3.36
INVS	Inversión	-3.36
TBP	TATA box binding protein	-3.35
DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III	-3.35
TFCP2	transcription factor CP2	-3.35
C17orf69	chromosome 17 open reading frame 69	-3.35
TMEM71	transmembrane protein 71	-3.35
CNOT8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	-3.35
CLCN7	chloride channel 7	-3.35
KIAA1429	KIAA1429	-3.35
EMR2	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2	-3.35
DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	-3.35
RN7SK	RNA, 7SK small nuclear	-3.35
TTN	titin	-3.35
SGPP2	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	-3.34
CHKB	choline kinase beta; carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	-3.34
DCLE1B	DNA cross-link repair 1B (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	-3.34
STK16	serine/threonine kinase 16	-3.34
OTOA	otoancorin	-3.34
HBB	hemoglobin, beta	-3.34
SFTPA1	surfactant protein A1B; surfactant protein A1	-3.33
ANP32F	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member F	-3.33
SLC45A4	solute carrier family 45, member 4	-3.33
HAS1	hyaluronan synthase 1	-3.32
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-3.32
TRY6	protease, serine, 1 (trypsin 1); trypsinogen C	-3.32
SRL	sarcalumenin	-3.31
TPM3	tropomyosin 3	-3.30
GNL3L	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like	-3.30
EFCAB2	EF-hand calcium binding domain 2	-3.30
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	-3.30
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	-3.29
PRB1	proline-rich protein BstNI subfamily 1; proline-rich protein BstNI subfamily 2; proline-rich protein BstNI subfamily 4	-3.29
PHC2	polyhomeotic homolog 2 (Drosophila)	-3.29
FSHB	follicle stimulating hormone, beta polypeptide	-3.28
BICD1	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	-3.28

## Resultados

NPHP1	nephronophthisis 1 (juvenile)	-3.28
FBXO22	FBXO22 opposite strand (non-protein coding); F-box protein 22 solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-3.28
SLC1A1		-3.28
KLHDC5	kelch domain containing 5	-3.27
C8orf17	chromosome 8 open reading frame 17	-3.27
IVD	isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	-3.27
PRPS2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	-3.27
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	-3.26
SYT7	synaptotagmin XVII; synaptotagmin VII	-3.26
PCDHGA1	protocadherin gamma subfamily A, 1	-3.25
CLPS	colipase, pancreatic	-3.25
RNF139	ring finger protein 139	-3.25
AMDHD2	amidohydrolase domain containing 2	-3.25
GRLF1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	-3.25
LOC219688	hypothetical protein LOC219688	-3.25
DGCR6L	DiGeorge syndrome critical region gene 6-like	-3.25
TRIOBP	TRIO and F-actin binding protein	-3.25
GRID2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	-3.25
SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	-3.25
ANKRD20A1	hCG2042718; chromosome 21 open reading frame 81; ankyrin repeat domain 20 family, member A1; ankyrin repeat domain 20 family, member A3; ankyrin repeat domain 20 family, member A2	-3.24
OR7E47P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene	-3.24
DHX37	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37	-3.23
HOXD8	homeobox D8	-3.23
ARID5A	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	-3.23
OR10J5	olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 5	-3.23
CARD14	caspase recruitment domain family, member 14	-3.23
GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	-3.23
GOT1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	-3.23
LOC340239	hypothetical LOC340239	-3.23
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	-3.23
TDRD1	tudor domain containing 1	-3.23
WDR17	WD repeat domain 17	-3.22
UST	uronyl-2-sulfotransferase	-3.22
DSG3	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	-3.22
LRRC28	leucine rich repeat containing 28	-3.22
LIN7B	lin-7 homolog B (C. elegans)	-3.22
NKRF	NFKB repressing factor	-3.22
OR4C6	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 6	-3.22
KRT6B	keratin 6B	-3.22
LOC203510	similar to hCG1644442	-3.21
ATXN2L	ataxin 2-like	-3.21
H2AFB3	H2A histone family, member B2; H2A histone family, member B3	-3.21
CDH23	cadherin-like 23	-3.21
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	-3.21
TRND	TRND; MTTD	-3.21
CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1	-3.21
SLCO6A1	solute carrier organic anion transporter family, member 6A1	-3.20
ZNF490	zinc finger protein 490	-3.19
FAM92B	family with sequence similarity 92, member B	-3.19
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	-3.19
AIP	aryl hydrocarbon receptor interacting protein	-3.18
MGC4473	hypothetical LOC79100	-3.18
UBAP2	ubiquitin associated protein 2	-3.18
MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	-3.18
OCRL	oculocerebrorenal syndrome of Lowe	-3.18
CCT6B	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	-3.18
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	-3.17
ITSN2	intersectin 2	-3.17
LAT	linker for activation of T cells	-3.17
PGC	progastricsin (pepsinogen C)	-3.17
ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5	-3.17
FLJ42291	hypothetical LOC346547	-3.17
LOC147646	hypothetical protein LOC147646	-3.16
C1orf113	chromosome 1 open reading frame 113	-3.16
ZNF516	zinc finger protein 516	-3.16
PEX1	peroxisomal biogenesis factor 1	-3.15



## Resultados

GAS2L3	growth arrest-specific 2 like 3	-3.15
PTCD2	pentatricopeptide repeat domain 2	-3.14
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	-3.14
TAGLN	transgelin	-3.14
TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy; regulator of telomere elongation helicase 1	-3.13
C6orf176	chromosome 6 open reading frame 176	-3.13
C14orf138	chromosome 14 open reading frame 138	-3.13
	histone cluster 1, H3j; histone cluster 1, H3i; histone cluster 1, H3h; histone cluster 1, H3g; histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3e; histone cluster 1, H3d; histone cluster 1, H3c; histone cluster 1, H3b; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H2ad; histone cluster 2, H3a; histone cluster 2, H3c; histone cluster 2, H3d	-3.13
HIST2H3C		-3.13
NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	-3.13
DMRTC1	DMRT-like family C1B; DMRT-like family C1	-3.13
PGCP	plasma glutamate carboxypeptidase	-3.13
CLYBL	citrate lyase beta like	-3.12
EDN1	endothelin 1	-3.11
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	-3.11
PTPRCAP	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	-3.11
ODF2	outer dense fiber of sperm tails 2	-3.11
PPP1R7	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	-3.10
KIF25	kinesin family member 25	-3.10
BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	-3.10
ETV4	ets variant 4	-3.10
C1orf91	chromosome 1 open reading frame 91	-3.10
NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	-3.09
HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	-3.09
GLT8D1	glycosyltransferase 8 domain containing 1	-3.09
DHX57	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57	-3.09
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	-3.08
FER1L4	fer-1-like 4 (C. elegans)	-3.08
EPHA6	EPH receptor A6	-3.08
FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	-3.08
WIZ	widely interspaced zinc finger motifs	-3.08
ZNF230	zinc finger protein 230	-3.07
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-3.07
RBBP4	hypothetical LOC642954; retinoblastoma binding protein 4	-3.07
	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	-3.06
HADHA		-3.06
TSC22D1	TSC22 domain family, member 1	-3.06
GLRB	glycine receptor, beta	-3.06
	SW/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	-3.05
SMARCE1		-3.05
IL21	interleukin 21	-3.05
PCDHGB6	protocadherin gamma subfamily B, 6	-3.05
LOC389246	VTI1B pseudogene	-3.05
ADAM28	ADAM metallopeptidase domain 28	-3.05
PELO	pelota homolog (Drosophila)	-3.04
EPB41L4B	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	-3.04
PPAPDC2	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 2	-3.04
ANAPC2	anaphase promoting complex subunit 2	-3.04
SSX4	synovial sarcoma, X breakpoint 4; synovial sarcoma, X breakpoint 4B	-3.04
PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	-3.04
ERCC8	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8	-3.04
AOX1	aldehyde oxidase 1	-3.04
PAK2	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	-3.03
NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	-3.03
RHBDF1	rhuboid 5 homolog 1 (Drosophila)	-3.03
RBM19	RNA binding motif protein 19	-3.02
PVRL3	poliovirus receptor-related 3	-3.02
KCNC2	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	-3.02
TIGD6	tigger transposable element derived 6	-3.02
	XK, Kell blood group complex subunit-related, Y-linked; XK, Kell blood group complex subunit-related, Y-linked 2	-3.02
XKRY		-3.02
	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	-3.01
ITGAL		-3.01
SLC25A30	solute carrier family 25, member 30	-3.01
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	-3.01
ZNF566	zinc finger protein 566	-3.01
ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	-3.01

## Resultados

NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	-3.01
HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	-3.01
KIAA1683	KIAA1683	-3.00
EFNA4	ephrin-A4	-3.00
CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	-3.00
POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	-3.00
KIAA1967	KIAA1967	-3.00
GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	-3.00
TRIM15	tripartite motif-containing 15	-3.00
LCE2D	late cornified envelope 2D	-2.99
MS4A2	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)	-2.99
ATF6	activating transcription factor 6	-2.99
ITPKC	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C	-2.99
PNKD	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	-2.98
LZTR1	leucine-zipper-like transcription regulator 1	-2.98
ADCK2	aarF domain containing kinase 2	-2.98
FAM98A	family with sequence similarity 98, member A	-2.97
YIPF4	Yip1 domain family, member 4	-2.97
ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	-2.97
WDR7	WD repeat domain 7	-2.97
QDPR	quinoid dihydropteridine reductase	-2.97
NCK1	NCK adaptor protein 1	-2.96
LOC283567	hypothetical protein LOC283567	-2.96
IL16	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	-2.96
SLMAP	sarcolemma associated protein	-2.96
IMP4	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	-2.95
RPN2	ribophorin II	-2.95
SPHAR	S-phase response (cyclin related)	-2.95
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	-2.95
IFT81	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)	-2.95
ADPRHL1	ADP-ribosylhydrolase like 1	-2.95
STRN4	striatin, calmodulin binding protein 4	-2.95
ZNF25	zinc finger protein 25	-2.94
LOC387647	patched domain containing 3 pseudogene	-2.94
KIR2DS1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5	-2.94
SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1	-2.94
RNF138	ring finger protein 138	-2.93
ZFP1	zinc finger protein 1 homolog (mouse)	-2.93
SUSD3	sushi domain containing 3	-2.93
CTAGE5	CTAGE family, member 5 pseudogene; CTAGE family member; CTAGE family, member 4; CTAGE family, member 5	-2.93
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	-2.93
COL18A1	collagen, type XVII, alpha 1	-2.93
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	-2.93
PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	-2.93
TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	-2.93
KBTBD6	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6	-2.92
LOC153684	hypothetical LOC153684	-2.92
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	-2.92
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	-2.92
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	-2.92
NR2F1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	-2.91
PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-2.91
B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	-2.91
UBOX5	U-box domain containing 5	-2.91
LUM	lumican	-2.90
SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	-2.90
SIPA1L3	signal-induced proliferation-associated 1 like 3	-2.90
SLC2A8	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 8	-2.90
ZNF275	zinc finger protein 275	-2.90
PEL1I	pellino homolog 1 (Drosophila)	-2.90
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein	-2.90
FDXR	ferredoxin reductase	-2.89
DND1	dead end homolog 1 (zebrafish); similar to dead end homolog 1	-2.89
PAH	phenylalanine hydroxylase	-2.89
C1orf135	chromosome 1 open reading frame 135	-2.89

## Resultados

ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	-2.88
RTN1	reticulon 1	-2.88
DEFB103A	defensin, beta 103B; defensin, beta 103A	-2.88
QTRTD1	queuine tRNA-ribosyltransferase domain containing 1	-2.88
PRIMA1	proline rich membrane anchor 1	-2.88
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	-2.88
PPY2	pancreatic polypeptide 2	-2.88
GIT2	G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2	-2.88
SYT11	synaptotagmin XI	-2.88
TCP11L1	t-complex 11 (mouse)-like 1	-2.88
TM2D3	TM2 domain containing 3	-2.87
KIF11	kinesin family member 11	-2.87
KIAA0232	KIAA0232	-2.87
GP5	glycoprotein V (platelet)	-2.86
B2M	beta-2-microglobulin	-2.86
RECQL	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	-2.86
LOC442389	interferon induced transmembrane protein pseudogene	-2.86
OXA1L	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	-2.86
SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	-2.86
SLC22A12	solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter), member 12	-2.86
C14orf104	chromosome 14 open reading frame 104	-2.86
PBX3	pre-B-cell leukemia homeobox 3	-2.85
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-2.85
NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	-2.85
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	-2.85
IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	-2.85
KIAA0913	KIAA0913	-2.84
ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	-2.84
OSBP2	oxysterol binding protein 2	-2.84
TLN1	talin 1	-2.84
KCMF1	potassium channel modulatory factor 1	-2.83
MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31	-2.83
ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	-2.83
ULBP1	UL16 binding protein 1	-2.83
PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	-2.83
C20orf194	chromosome 20 open reading frame 194	-2.83
C22orf9	chromosome 22 open reading frame 9	-2.82
NUDT12	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12	-2.81
RPE	rcRPE; ribulose-5-phosphate-3-epimerase	-2.81
CTAG2	cancer/testis antigen 2	-2.81
DHX30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	-2.81
PPP2R2C	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma isoform	-2.80
CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	-2.80
TEP1	telomerase-associated protein 1	-2.79
MEIS3	Meis homeobox 3; Meis homeobox 3 pseudogene 2	-2.79
UBE2L3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	-2.79
SELT	selenoprotein T; similar to Selenoprotein T	-2.79
LOC152905	reticulon protein 3 pseudogene	-2.79
RPS16	ribosomal protein S16 pseudogene 1; ribosomal protein S16 pseudogene 10; ribosomal protein S16	-2.79
JAZF1	JAZF zinc finger 1	-2.79
ZNF81	zinc finger protein 81	-2.78
TREML2	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2 pseudogene; triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	-2.78
RAD51C	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	-2.78
DGCR2	DiGeorge syndrome critical region gene 2	-2.78
PXK	PX domain containing serine/threonine kinase	-2.78
NIPBL	Nipped-B homolog (Drosophila)	-2.77
DUSP18	dual specificity phosphatase 18	-2.77
ZNF155	zinc finger protein 155	-2.77
NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa	-2.77
WDFY3	WD repeat and FYVE domain containing 3	-2.77
ANKHD1	ankyrin repeat and KH domain containing 1; ANKHD1-EIF4EBP3 readthrough transcript; eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 3	-2.77
PSD4	pleckstrin and Sec7 domain containing 4	-2.77
IFT122	intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)	-2.76
POLR3D	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa	-2.76
B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	-2.76
MPV17	MpV 17 mitochondrial inner membrane protein	-2.76
HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	-2.76

## Resultados

ZNF689	zinc finger protein 689	-2.75
STK32B	serine/threonine kinase 32B	-2.75
BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	-2.75
DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)	-2.74
MOSPD2	motile sperm domain containing 2	-2.74
LIMK1	LIM domain kinase 1	-2.74
KIF15	kinesin family member 15	-2.74
EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2	-2.74
LRRC23	leucine rich repeat containing 23	-2.73
IL32	interleukin 32	-2.73
PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	-2.73
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	-2.73
ZNF630	zinc finger protein 630	-2.73
MYO1D	myosin ID	-2.73
CYP4Z1	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1	-2.73
OTUD4	OTU domain containing 4	-2.72
VWCE	von Willebrand factor C and EGF domains	-2.72
ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21	-2.72
GCN1L1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	-2.72
PDLIM2	PDZ and LIM domain 2 (mystique)	-2.72
CD244	CD244 molecule, natural killer cell receptor 2B4	-2.72
ANAPC7	anaphase promoting complex subunit 7	-2.72
CCRN4L	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	-2.72
TRNT1	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1	-2.71
UTS2R	urotensin 2 receptor	-2.71
SHC3	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	-2.71
KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	-2.71
RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	-2.71
SGCA	sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-2.71
KIF9	kinesin family member 9	-2.71
FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	-2.70
ANP32C	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member C	-2.70
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	-2.70
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	-2.70
INPP5B	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 75kDa	-2.70
LAP3	leucine aminopeptidase 3	-2.70
PRKAG1	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit	-2.70
CDCA7	cell division cycle associated 7	-2.70
ZFP64	zinc finger protein 64 homolog (mouse)	-2.69
CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	-2.69
PPP1R1B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	-2.69
PRPF19	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae)	-2.69
USP24	ubiquitin specific peptidase 24	-2.69
CTBP2	C-terminal binding protein 2	-2.69
ZNF430	zinc finger protein 430	-2.69
NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-2.69
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	-2.69
F2RL3	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3	-2.68
TSPY1	testis specific protein, Y-linked 3; testis specific protein, Y-linked 2; testis specific protein, Y-linked 1; testis specific protein, Y-linked pseudogene 7	-2.68
KIFC2	kinesin family member C2	-2.68
CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	-2.68
C9orf24	chromosome 9 open reading frame 24	-2.68
PNCK	pregnancy up-regulated non-ubiquitously expressed CaM kinase	-2.68
SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	-2.68
RER1	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)	-2.67
HEBP1	heme binding protein 1	-2.67
CLCN6	chloride channel 6	-2.67
MF12	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	-2.67
ANXA7	annexin A7	-2.67
KT112	KT112 homolog, chromatin associated (S. cerevisiae)	-2.67
CTSL2	cathepsin L2	-2.66
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	-2.66
OMA1	OMA1 homolog, zinc metallopeptidase (S. cerevisiae)	-2.66
KIF13A	kinesin family member 13A	-2.66
CCNE2	cyclin E2	-2.66
RNF126	ring finger protein 126	-2.65
MMP23B	matrix metallopeptidase 23A (pseudogene); matrix metallopeptidase 23B	-2.65
RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)	-2.65

## Resultados

ORMDL1	ORM1-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.65
TRIM23	tripartite motif-containing 23	-2.64
FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	-2.64
WDR48	WD repeat domain 48	-2.64
ME2	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	-2.64
SLC25A25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	-2.64
OPN1MW	opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive	-2.63
LOC90499	hypothetical protein LOC90499	-2.63
HCFC1	host cell factor C1 (VP16-accessory protein)	-2.63
GNE	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	-2.63
KIAA2026	KIAA2026	-2.63
LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	-2.63
MFN2	mitofusin 2	-2.63
DCTN4	dynactin 4 (p62)	-2.63
IL28RA	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)	-2.62
PAQR6	progesterin and adipoQ receptor family member VI	-2.62
WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1	-2.62
TPD52	tumor protein D52	-2.62
TMBIM4	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4	-2.62
SETD1B	SET domain containing 1B	-2.62
CHKA	choline kinase alpha	-2.62
RDM1	RAD52 motif 1	-2.62
LUC7L	LUC7-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.61
CNTNAP4	contactin associated protein-like 4	-2.61
TMPO	thymopoietin	-2.61
ZNF443	zinc finger protein 443	-2.61
RCOR3	REST corepressor 3	-2.61
SPTB	spectrin, beta, erythrocytic	-2.61
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	-2.60
ZNF440	zinc finger protein 440	-2.60
PALM2	A kinase (PRKA) anchor protein 2; paraelemmin 2; PALM2-AKAP2 readthrough transcript	-2.60
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	-2.60
TRIM29	tripartite motif-containing 29	-2.60
PCBP3	poly(rC) binding protein 3	-2.59
TPSG1	tryptase gamma 1	-2.59
EXTL3	exostoses (multiple)-like 3	-2.59
CNTRF	ciliary neurotrophic factor receptor	-2.59
ZHX1	zinc fingers and homeoboxes 1	-2.58
GGT1	gamma-glutamyltransferase light chain 3; gamma-glutamyltransferase 4 pseudogene;	-2.58
GRM5	glutamate receptor, metabotropic 5	-2.58
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	-2.57
DNAJC5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5	-2.57
CCDC40	coiled-coil domain containing 40	-2.57
KRTAP4-11	keratin associated protein 4-6; keratin associated protein 4-7; keratin associated protein	-2.57
ZNF284	zinc finger protein 284	-2.57
C7orf29	chromosome 7 open reading frame 29	-2.56
SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	-2.56
SERAC1	serine active site containing 1	-2.56
IGKC	similar to hCG26659; immunoglobulin kappa constant; similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor	-2.56
ALG2	asparagine-linked glycosylation 2, alpha-1,3-mannosyltransferase homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.56
COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	-2.55
LCE5A	late cornified envelope 5A	-2.55
FAM102B	family with sequence similarity 102, member B	-2.55
CCDC15	coiled-coil domain containing 15	-2.55
BPGM	2,3-bisphosphoglycerate mutase	-2.55
CTSO	cathepsin O	-2.55
GALNS	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase	-2.55
SMU1	smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog ( <i>C. elegans</i> )	-2.55
C9orf78	chromosome 9 open reading frame 78	-2.55
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-2.55
DKFZp434E1119	hypothetical protein DKFZp434E1119	-2.55
PAQR8	progesterin and adipoQ receptor family member VIII	-2.55
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1	-2.54
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	-2.54

## Resultados

ITPK1	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	-2.54
TAC4	tachykinin 4 (hemokinin)	-2.54
ZNF721	zinc finger protein 721	-2.54
CCRL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	-2.54
ADAMTSL4	ADAMTS-like 4	-2.54
MLF2	myeloid leukemia factor 2	-2.54
ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	-2.54
PCBP2	poly(rC) binding protein 2	-2.54
OSBPL7	oxysterol binding protein-like 7	-2.54
FAM30A	family with sequence similarity 30, member A	-2.53
ANGPTL4	angiotensin-like 4	-2.53
NOS1AP	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein	-2.53
RNF185	ring finger protein 185	-2.53
DNAJC6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	-2.53
ETV5	ets variant 5	-2.53
KNDC1	kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1	-2.53
KLHL20	kelch-like 20 (Drosophila)	-2.53
C6orf136	chromosome 6 open reading frame 136	-2.53
TMEM33	transmembrane protein 33	-2.53
FUT6	fucosyltransferase 6 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	-2.53
CNGA2	cyclic nucleotide gated channel alpha 2	-2.52
PPP1R3G	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3G	-2.52
RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae) cell division cycle 26 homolog (S. cerevisiae); cell division cycle 26 homolog (S. cerevisiae) pseudogene	-2.52
CDC26	cerevisiae pseudogene	-2.52
RUFY3	RUN and FYVE domain containing 3	-2.52
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	-2.52
VPS16	vacuolar protein sorting 16 homolog A (S. cerevisiae)	-2.52
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1	-2.52
KCNK17	potassium channel, subfamily K, member 17	-2.52
LAMA5	laminin, alpha 5	-2.52
TPSAB1	tryptase alpha/beta 1; tryptase beta 2	-2.51
GPR161	G protein-coupled receptor 161	-2.51
C13orf1	chromosome 13 open reading frame 1	-2.51
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-2.51
C1orf77	chromosome 1 open reading frame 77	-2.51
MICAL3	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3	-2.51
TIAF1	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	-2.51
GGCX	gamma-glutamyl carboxylase	-2.50
PFDN1	prefoldin subunit 1	-2.50
SARS2	seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial G protein-coupled receptor 89C; G protein-coupled receptor 89B; G protein-coupled receptor 89A	-2.50
GPR89A	receptor 89A	-2.50
PRSS23	protease, serine, 23	-2.50
RASSF7	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 7	-2.50
DERL1	Der1-like domain family, member 1	-2.50
BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	-2.50
BCAP29	B-cell receptor-associated protein 29	-2.49
EGLN2	egl nine homolog 2 (C. elegans)	-2.49
PLA2R1	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	-2.49
CDC27	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)	-2.49
AMN	amionless homolog (mouse)	-2.49
C1orf103	chromosome 1 open reading frame 103	-2.49
C10orf111	chromosome 10 open reading frame 111	-2.49
ZNF264	zinc finger protein 264	-2.49
LOC253039	hypothetical LOC253039	-2.48
ODF2L	outer dense fiber of sperm tails 2-like	-2.48
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26	-2.48
FIGNL1	fidgetin-like 1	-2.48
SEC24A	SEC24 family, member A (S. cerevisiae)	-2.47
C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	-2.47
SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	-2.47
GPR116	G protein-coupled receptor 116	-2.47
C11orf1	chromosome 11 open reading frame 1 basic leucine zipper and W2 domains 1 pseudogene 1; basic leucine zipper and W2 domains 1 like 1; basic leucine zipper and W2 domains 1	-2.46
BZW1	domains 1 like 1; basic leucine zipper and W2 domains 1	-2.46
CCNG1	cyclin G1	-2.46
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	-2.46
USP36	ubiquitin specific peptidase 36	-2.46
PDE8A	phosphodiesterase 8A	-2.46

## Resultados

KCTD13	potassium channel tetramerisation domain containing 13	-2.46
ZNF175	zinc finger protein 175	-2.45
USP30	ubiquitin specific peptidase 30	-2.45
CA2	carbonic anhydrase II	-2.45
EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta, 67kDa	-2.45
MEIS3P1	Meis homeobox 3 pseudogene 1	-2.45
NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	-2.45
TRNK	trnK	-2.45
HIC2	hypermethylated in cancer 2	-2.45
C20orf29	chromosome 20 open reading frame 29	-2.45
TMEM39B	transmembrane protein 39B	-2.44
LOC339984	hypothetical protein LOC339984	-2.44
TOPBP1	topoisomerase (DNA) II binding protein 1	-2.44
C9orf85	chromosome 9 open reading frame 85	-2.44
LPPR2	lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	-2.44
PCDHGB4	protocadherin gamma subfamily B, 4	-2.44
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	-2.44
EIF4B	similar to eukaryotic translation initiation factor 4H; eukaryotic translation initiation factor 4B	-2.44
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	-2.43
DSCR3	Down syndrome critical region gene 3	-2.43
COPE	coatamer protein complex, subunit epsilon	-2.43
RBMX	similar to RNA binding motif protein, X-linked; similar to hCG2011544; RNA binding motif protein, X-linked	-2.43
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	-2.43
MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	-2.42
FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B	-2.42
TPP1	tripeptidyl peptidase I	-2.42
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	-2.42
NUCB2	nucleobindin 2	-2.42
FHOD3	formin homology 2 domain containing 3	-2.42
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	-2.41
SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-2.41
CSTF2T	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa, tau variant	-2.41
ITGB3BP	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	-2.41
POMZP3	POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion	-2.41
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	-2.41
RTEL1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy; regulator of telomere elongation helicase 1	-2.41
GLB1	galactosidase, beta 1	-2.40
FAM55C	family with sequence similarity 55, member C	-2.40
AK2	adenylate kinase 2	-2.40
RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	-2.40
YLPM1	YLP motif containing 1	-2.40
TSPYL4	TSPY-like 4	-2.40
MIS12	MIS12, MIND kinetochore complex component, homolog (S. pombe)	-2.39
ZNF554	zinc finger protein 554	-2.39
OTUD6B	OTU domain containing 6B	-2.39
TMTC3	transmembrane and tetra-tricopeptide repeat containing 3	-2.39
HOOK2	hook homolog 2 (Drosophila)	-2.39
DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	-2.39
CSAG1	chondrosarcoma associated gene 1	-2.39
PCDHGB3	protocadherin gamma subfamily B, 3	-2.38
TOP1P1	topoisomerase (DNA) I pseudogene 1	-2.38
PACS1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	-2.38
ANTXR1	anthrax toxin receptor 1	-2.38
NHSL1	NHS-like 1	-2.38
PLCB2	phospholipase C, beta 2	-2.38
ZFAND1	zinc finger, AN1-type domain 1	-2.38
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	-2.38
ORC3L	origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)	-2.37
TMEM68	transmembrane protein 68	-2.37
ATG7	ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)	-2.37
TIMM17B	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)	-2.37
TRNP	TRNP; MTPP	-2.37
LOC392787	similar to tripartite motif protein 2	-2.37
TRAPP6A	trafficking protein particle complex 6A	-2.37
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	-2.37
STMN1	stathmin 1	-2.37
PCDHGB2	protocadherin gamma subfamily B, 2	-2.37

## Resultados

EVC	Ellis van Creveld syndrome	-2.37
CGB2	chorionic gonadotropin, beta polypeptide 2	-2.36
RNF146	ring finger protein 146	-2.36
RHOBTB2	Rho-related BTB domain containing 2	-2.36
FASTK	Fas-activated serine/threonine kinase	-2.36
ACTL6B	actin-like 6B	-2.35
C11orf48	chromosome 11 open reading frame 48	-2.35
ATP9A	ATPase, class II, type 9A	-2.35
FADS1	fatty acid desaturase 1	-2.35
TMPRSS3	transmembrane protease, serine 3	-2.35
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	-2.35
SETD4	SET domain containing 4	-2.35
DUSP11	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)	-2.34
KIF20A	kinesin family member 20A	-2.34
TREX2	three prime repair exonuclease 2; HAUS augmin-like complex, subunit 7	-2.34
VCP1P1	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	-2.34
GRHPR	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-2.34
CUL2	cullin 2	-2.34
HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	-2.34
NCOA4	nuclear receptor coactivator 4	-2.34
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	-2.34
NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	-2.33
GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits	-2.33
TLL12	tubulin tyrosine ligase-like family, member 12	-2.33
RPA4	replication protein A4, 34kDa	-2.33
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-2.33
C14orf26	chromosome 14 open reading frame 26	-2.32
ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	-2.32
TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	-2.32
ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)	-2.32
MRPS28	mitochondrial ribosomal protein S28	-2.32
BLMH	bleomycin hydrolase	-2.32
CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	-2.31
SLC29A4	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4; similar to solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4	-2.31
DNM1L	dynamitin 1-like	-2.31
HAGHL	hydroxyacylglutathione hydrolase-like	-2.31
NR1D2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	-2.31
SLC26A9	solute carrier family 26, member 9	-2.31
TAF6	TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 80kDa	-2.31
C9orf109	chromosome 9 open reading frame 109	-2.30
BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A2	-2.30
KIAA0196	KIAA0196	-2.30
MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1	-2.30
TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	-2.30
TPM4	tropomyosin 4	-2.30
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	-2.30
LOC285141	similar to CG14853-PB	-2.30
NUP37	nucleoporin 37kDa	-2.30
MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	-2.30
MTMR2	myotubularin related protein 2	-2.30
LOC284233	hypothetical LOC284233	-2.30
DHX32	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32	-2.30
EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	-2.30
ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	-2.30
CCDC28B	coiled-coil domain containing 28B	-2.29
CLCN2	chloride channel 2	-2.29
OBP2A	odorant binding protein 2A	-2.29
MEP1A	mepirin A, alpha (PABA peptide hydrolase)	-2.29
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	-2.29
STYX	serine/threonine/tyrosine interacting protein	-2.29
PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A	-2.29
CNTF	zinc finger protein 91 homolog (mouse); ZFP91-CNTF readthrough transcript; ciliary neurotrophic factor	-2.28
SPATA21	spermatogenesis associated 21	-2.28
PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	-2.28
ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	-2.28
LOC389599	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 2 pseudogene	-2.28
ZNF292	zinc finger protein 292	-2.28



## Resultados

TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	-2.28
MAP3K10	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	-2.28
CLOCK	clock homolog (mouse)	-2.28
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-2.28
LDLR	low density lipoprotein receptor	-2.28
NRD1	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	-2.28
LOC286178	hypothetical protein LOC286178	-2.27
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	-2.27
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	-2.27
E2F3	E2F transcription factor 3	-2.27
EBI3	Epstein-Barr virus induced 3	-2.27
WBP11	WW domain binding protein 11	-2.26
FHL1	four and a half LIM domains 1	-2.26
SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1	-2.26
C16orf53	chromosome 16 open reading frame 53	-2.26
UBL5	ubiquitin-like 5	-2.26
NLGN2	neuroligin 2	-2.26
CD109	CD109 molecule	-2.26
LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	-2.26
SCYL3	SCY1-like 3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.26
SUPV3L1	suppressor of var1, 3-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.26
UBP1	upstream binding protein 1 (LBP-1a)	-2.25
PRODH2	proline dehydrogenase (oxidase) 2	-2.25
SH3BP4	SH3-domain binding protein 4	-2.25
DDX27	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27	-2.25
BRD4	bromodomain containing 4	-2.25
PRSS8	protease, serine, 8	-2.25
CBWD1	COBW domain containing 6; COBW domain containing 1	-2.24
MSRA	methionine sulfoxide reductase A	-2.24
	RANBP2-like and GRIP domain containing 5; RANBP2-like and GRIP domain containing 4; RANBP2-like and GRIP domain containing 3; RANBP2-like and GRIP domain containing 8; RANBP2-like and GRIP domain containing 7; RANBP2-like and GRIP domain containing 6	-2.24
RGPD4		-2.24
RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	-2.24
HTR3E	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3, family member E	-2.24
DCTN6	dynactin 6	-2.24
GSTA1	glutathione S-transferase alpha 1	-2.23
TICAM1	toll-like receptor adaptor molecule 1	-2.23
GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4	-2.23
C21orf33	chromosome 21 open reading frame 33	-2.23
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	-2.23
MYO9B	myosin IXB	-2.23
CTNS	cystinosis, nephropathic	-2.22
PLRG1	pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis)	-2.22
CBWD2	COBW domain containing 2	-2.22
ZNF197	zinc finger protein 197	-2.22
USP6NL	USP6 N-terminal like	-2.22
SLC41A1	solute carrier family 41, member 1	-2.22
GSTA4	glutathione S-transferase alpha 4	-2.21
C1orf123	chromosome 1 open reading frame 123	-2.21
CCDC66	coiled-coil domain containing 66	-2.21
OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	-2.20
LOC389831	hypothetical gene supported by AL713796	-2.20
DGCR14	DiGeorge syndrome critical region gene 14	-2.20
SPATS2	spermatogenesis associated, serine-rich 2	-2.20
KRT18	keratin 18; keratin 18 pseudogene 26; keratin 18 pseudogene 19	-2.20
CD82	CD82 molecule	-2.19
LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	-2.19
TUSC2	tumor suppressor candidate 2	-2.19
CD274	CD274 molecule	-2.19
SNRNPB2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B"	-2.19
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-2.19
FAM76B	family with sequence similarity 76, member B	-2.19
RHCE	Rh blood group, CcEe antigens	-2.19
THOC3	similar to THO complex 3; THO complex 3	-2.19
STXBP1	syntaxin binding protein 1	-2.18
TMEM42	transmembrane protein 42	-2.18
RAP1B	RAP1B, member of RAS oncogene family	-2.18
	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific)	-2.18
PLEKHA4	member 4	-2.18

## Resultados

ALCAM	hypothetical protein LOC100133690; activated leukocyte cell adhesion molecule	-2.18
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	-2.18
FAM83A	family with sequence similarity 83, member A	-2.18
PARP6	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 6	-2.17
ASB16	ankyrin repeat and SOCS box-containing 16	-2.17
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	-2.17
LOC349114	hypothetical LOC349114	-2.17
RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	-2.17
ZC3H7A	zinc finger CCCH-type containing 7A	-2.17
C3	similar to Complement C3 precursor; complement component 3; hypothetical protein LOC100133511	-2.17
DPP3	dipeptidyl-peptidase 3	-2.17
ZNF226	zinc finger protein 226	-2.17
PC	pyruvate carboxylase	-2.17
LOC134505	similar to hCG39609	-2.17
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	-2.16
RDH13	retinol dehydrogenase 13 (all-trans/9-cis)	-2.16
MDC1	mediator of DNA-damage checkpoint 1	-2.16
ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	-2.16
DDO	D-aspartate oxidase	-2.16
ARIH2	ariadne homolog 2 (Drosophila)	-2.16
C1orf156	chromosome 1 open reading frame 156	-2.16
CNTNAP3B	contactin associated protein-like 3; contactin associated protein-like 3B	-2.15
RCHY1	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1	-2.15
POLK	polymerase (DNA directed) kappa	-2.15
ATP5G2	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9)	-2.15
CEP55	centrosomal protein 55kDa	-2.15
LOC253842	hypothetical protein LOC253842	-2.15
MRPL27	mitochondrial ribosomal protein L27	-2.15
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-2.15
SCAMP3	secretory carrier membrane protein 3	-2.15
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	-2.14
DYNC1I2	similar to dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2; dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2	-2.14
TIGD4	tigger transposable element derived 4	-2.14
BTBD1	BTB (POZ) domain containing 1	-2.14
PLEKHG4	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4	-2.14
PHF1	PHD finger protein 1	-2.14
TMC2	transmembrane channel-like 2	-2.14
ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	-2.14
CA13	carbonic anhydrase XIII	-2.14
GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)	-2.14
GEMIN5	gem (nuclear organelle) associated protein 5	-2.13
KIAA0355	KIAA0355	-2.13
USP40	ubiquitin specific peptidase 40	-2.13
DMTF1	cyclin D binding myb-like transcription factor 1	-2.13
RAB36	RAB36, member RAS oncogene family	-2.13
TBC1D12	TBC1 domain family, member 12	-2.13
CAPN1	calpain 1, (mu/l) large subunit	-2.13
KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	-2.13
POT1	POT1 protection of telomeres 1 homolog (S. pombe)	-2.13
ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	-2.12
PCDHGB1	protocadherin gamma subfamily B, 1	-2.12
FAM60A	similar to hCG2020539; family with sequence similarity 60, member A; similar to family with sequence similarity 60, member A	-2.12
SPATA13	spermatogenesis associated 13	-2.12
KIAA1430	KIAA1430	-2.12
NR1H2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	-2.12
C9orf91	chromosome 9 open reading frame 91	-2.12
FOXRED1	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1	-2.12
CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	-2.12
C14orf70	chromosome 14 open reading frame 70	-2.12
C12orf29	chromosome 12 open reading frame 29	-2.12
PILRB	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	-2.11
C6orf52	chromosome 6 open reading frame 52	-2.11
TBC1D10C	TBC1 domain family, member 10C	-2.11
LOC401400	hypothetical LOC401400	-2.11
TLK1	tousled-like kinase 1	-2.11
SPIRE1	spire homolog 1 (Drosophila)	-2.10

## Resultados

PARVA	parvin, alpha	-2.10
MGEA5	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	-2.10
RBM22	RNA binding motif protein 22	-2.10
OBF1	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	-2.10
SIAH2	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	-2.10
CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	-2.10
ITGB5	integrin, beta 5	-2.09
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	-2.09
VARS	valyl-tRNA synthetase	-2.09
ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	-2.09
TENC1	tensin like C1 domain containing phosphatase (tensin 2)	-2.09
PKN2	protein kinase N2	-2.09
PRPF4B	similar to hCG1820375; PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	-2.09
FAM103A1	family with sequence similarity 103, member A1	-2.09
HBZ	hemoglobin, zeta	-2.09
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	-2.09
ZNF217	zinc finger protein 217	-2.09
REEP4	receptor accessory protein 4	-2.08
SPG21	spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome)	-2.08
DGA2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	-2.08
C6orf89	chromosome 6 open reading frame 89	-2.08
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	-2.08
ZFYVE9	zinc finger, FYVE domain containing 9	-2.08
CDYL	chromodomain protein, Y-like	-2.08
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	-2.08
SPATA5L1	spermatogenesis associated 5-like 1	-2.08
WDR37	WD repeat domain 37	-2.08
TTC1	tetratricopeptide repeat domain 1	-2.08
ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide, pseudogene 4; alcohol dehydrogenase 5 (class II), chi polypeptide	-2.08
C4BPB	complement component 4 binding protein, beta	-2.08
MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-2.07
LOC200609	hypothetical protein LOC200609	-2.07
COTL1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	-2.07
TLR5	toll-like receptor 5	-2.07
EI24	etoposide induced 2.4 mRNA	-2.07
NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)	-2.06
CHURC1	churchill domain containing 1	-2.06
RNF103	vacuolar protein sorting 24 homolog (S. cerevisiae); ring finger protein 103	-2.06
VNN1	vanin 1	-2.06
CTDSPL2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2	-2.06
YTHDF3	YTH domain family, member 3	-2.06
GAST	gastrin	-2.06
ERF	Ets2 repressor factor	-2.06
PSMD5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	-2.06
KHK	ketoheksokinase (fructokinase)	-2.06
ANKDD1A	ankyrin repeat and death domain containing 1A	-2.05
NUP160	nucleoporin 160kDa	-2.05
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	-2.05
HPCAL1	hippocalcin-like 1	-2.05
SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24	-2.05
NOMO1	NODAL modulator 3; NODAL modulator 1; NODAL modulator 2	-2.05
DHX8	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8	-2.05
SRP19	signal recognition particle 19kDa	-2.05
ADRA1B	adrenergic, alpha-1B-, receptor	-2.05
KLK1	kallikrein 1	-2.05
DNAJC19	similar to translocase of the inner mitochondrial membrane 14; DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19	-2.04
LSM6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	-2.04
MEF2B	LOC729991-MEF2B readthrough transcript; myocyte enhancer factor 2B	-2.04
POGZ	pogo transposable element with ZNF domain	-2.04
RDH14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis); 5'-nucleotidase, cytosolic IB	-2.04
TOP1	topoisomerase (DNA) I	-2.04
WWC1	WW and C2 domain containing 1	-2.04
POLR3GL	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)-like	-2.03
CTDSP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1	-2.03
USP7	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	-2.03
C20orf152	chromosome 20 open reading frame 152	-2.03
C3orf33	chromosome 3 open reading frame 33	-2.02

## Resultados

SGTA	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha	-2.02
C21orf58	chromosome 21 open reading frame 58	-2.02
NUAK1	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	-2.02
ANP32A	hepatopoietin PCn127; acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	-2.02
BIVM	basic, immunoglobulin-like variable motif containing	-2.02
HSA251708	microtubule-binding protein-like	-2.02
ZNF248	zinc finger protein 248	-2.02
CRY2	cryptochrome 2 (photolyase-like)	-2.01
DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	-2.01
ANAPC10	anaphase promoting complex subunit 10; anaphase promoting complex subunit 10 pseudogene	-2.01
C3orf38	chromosome 3 open reading frame 38	-2.01
C6orf129	chromosome 6 open reading frame 129	-2.01
CHEK2	protein kinase CHK2-like; CHK2 checkpoint homolog (S. pombe); similar to hCG1983233	-2.01
LOC441050	hCG2026038	-2.01
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	-2.01
VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	-2.01
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	-2.01
LETMD1	LETM1 domain containing 1	-2.00
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	-2.00
ARL16	ADP-ribosylation factor-like 16	-2.00
TSC22D4	TSC22 domain family, member 4	-2.00
NEK6	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	-2.00
PHACTR4	phosphatase and actin regulator 4	-2.00
ANKRD12	ankyrin repeat domain 12	-2.00
IKBKE	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	-2.00
ZNF331	zinc finger protein 331	-2.00
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	-1.99
DENN4A	DENN/MADD domain containing 4A	-1.99
KIAA1143	KIAA1143	-1.99
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	-1.99
SCYL2	SCY1-like 2 (S. cerevisiae)	-1.99
ZFYVE26	zinc finger, FYVE domain containing 26	-1.99
CECR5	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5	-1.99
LOC402778	similar to RIKEN cDNA 6330512M04 gene (mouse)	-1.99
CCNT2	cyclin T2	-1.98
MRPL11	mitochondrial ribosomal protein L11	-1.98
RPL7L1	ribosomal protein L7-like 1; ribosomal protein L7 pseudogene 14; ribosomal protein L7 pseudogene 21; ribosomal protein L7 pseudogene 22; ribosomal protein L7 pseudogene 46	-1.98
GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2	-1.98
MPDZ	multiple PDZ domain protein	-1.98
PLCXD1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	-1.98
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-1.98
MGC16121	hypothetical protein MGC16121	-1.98
HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)	-1.98
C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	-1.98
UMPS	uridine monophosphate synthetase	-1.97
FAM58B	family with sequence similarity 58, member B	-1.97
DPP7	dipeptidyl-peptidase 7	-1.97
ATXN7L2	ataxin 7-like 2	-1.97
LRRC47	leucine rich repeat containing 47	-1.97
ANP32B	similar to Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B (PHA P12 protein) (Silver-stainable protein SSP29) (Acidic protein rich in leucines); acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	-1.97
DIAPH1	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	-1.97
RBM8A	RNA binding motif protein 8A	-1.96
HDHD2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	-1.96
ST5	suppression of tumorigenicity 5	-1.96
C10orf118	chromosome 10 open reading frame 118	-1.96
PRKCA	protein kinase C, alpha	-1.96
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	-1.96
LHX6	LIM homeobox 6	-1.96
CRAMP1L	Crm, cramped-like (Drosophila)	-1.96
CRYZL1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	-1.96
SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3	-1.96
ZNF622	zinc finger protein 622	-1.96
LOC202781	hypothetical protein LOC202781	-1.96

## Resultados

FNBP1L	formin binding protein 1-like	-1.95
C17orf39	chromosome 17 open reading frame 39	-1.95
PPP3CB	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform	-1.95
TRND	trnD	-1.95
CNN2	calponin 2	-1.95
FBXO8	F-box protein 8	-1.95
PLEKHH2	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 2	-1.95
SNX1	sorting nexin 1	-1.95
C20orf12	chromosome 20 open reading frame 12	-1.95
ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	-1.94
VPS26B	vacuolar protein sorting 26 homolog B (S. pombe)	-1.94
DNNTIP1	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 1	-1.94
ARNTL2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	-1.94
BRE	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	-1.94
DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	-1.94
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	-1.94
KIAA1586	KIAA1586	-1.93
MPP5	membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	-1.93
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	-1.93
PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	-1.93
POPDC3	popeye domain containing 3	-1.93
ARID3B	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)	-1.93
CCDC33	coiled-coil domain containing 33	-1.93
PREB	prolactin regulatory element binding	-1.93
RNF13	ring finger protein 13	-1.93
GTPBP2	GTP binding protein 2	-1.92
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	-1.92
ICK	intestinal cell (MAK-like) kinase	-1.92
IGHV1-69	immunoglobulin heavy variable 1-69; similar to hCG1773549	-1.92
CLDN11	claudin 11	-1.92
PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1	-1.92
IRF5	interferon regulatory factor 5	-1.92
SMG6	Smg-6 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	-1.91
SNX27	sorting nexin family member 27	-1.91
C9orf114	chromosome 9 open reading frame 114	-1.91
BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6	-1.91
PHB	prohibitin	-1.91
SSR1	signal sequence receptor, alpha	-1.91
ADCY7	adenylate cyclase 7	-1.91
STAU1	staufer, RNA binding protein, homolog 1 (Drosophila)	-1.91
GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	-1.91
C3orf34	chromosome 3 open reading frame 34	-1.90
F12	coagulation factor XII (Hageman factor)	-1.90
NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	-1.90
ZNF83	zinc finger protein 83	-1.90
ZNF207	zinc finger protein 207	-1.90
LOC389834	ankyrin repeat domain 57 pseudogene	-1.90
CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.90
GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1.90
NFYB	nuclear transcription factor Y, beta	-1.90
ZC3HC1	zinc finger, C3HC-type containing 1	-1.89
CKAP5	cytoskeleton associated protein 5	-1.89
MTMR12	myotubularin related protein 12	-1.89
LEPR	leptin receptor	-1.89
PUM2	pumilio homolog 2 (Drosophila)	-1.89
C6orf167	chromosome 6 open reading frame 167	-1.89
APRT	adenine phosphoribosyltransferase	-1.89
PCMTD1	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1	-1.89
RFK	riboflavin kinase	-1.89
ND2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	-1.89
TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2	-1.89
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	-1.89
PDE4DIP	hypothetical protein LOC100134230; similar to KIAA0454 protein; similar to phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 2; phosphodiesterase 4D interacting protein	-1.89
TCEB3	transcription elongation factor B (SII), polypeptide 3 (110kDa, elongin A)	-1.89
RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	-1.88
MED25	mediator complex subunit 25	-1.88

## Resultados

HS3ST1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	-1.88
PCGF5	polycomb group ring finger 5	-1.88
FZD6	frizzled homolog 6 (Drosophila)	-1.88
XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)	-1.88
EEFSEC	eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific	-1.88
SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	-1.88
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-1.87
TNPO1	transportin 1	-1.87
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	-1.87
MKLN1	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	-1.87
PTGIR	prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	-1.87
IRF2	interferon regulatory factor 2	-1.87
NFE2L3	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	-1.87
AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8	-1.86
SUDS3	suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)	-1.86
UNC50	unc-50 homolog (C. elegans)	-1.86
FES	feline sarcoma oncogene	-1.86
FSTL1	folliculin-like 1	-1.86
CAMK1D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	-1.86
DLST	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex); dihydrolipoamide S-succinyltransferase pseudogene (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	-1.86
PPM1A	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	-1.86
LYST	lysosomal trafficking regulator	-1.86
MFNG	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-1.86
MRPL10	mitochondrial ribosomal protein L10	-1.86
EXTL2	exostoses (multiple)-like 2	-1.86
NOSIP	nitric oxide synthase interacting protein	-1.85
GOLGA8B	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B; golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	-1.85
C9orf25	chromosome 9 open reading frame 25	-1.85
PAN3	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)	-1.85
PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	-1.85
CTSF	cathepsin F	-1.85
KLHL15	kelch-like 15 (Drosophila)	-1.85
SSR3	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	-1.85
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	-1.84
LRRC20	leucine rich repeat containing 20	-1.84
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	-1.84
COQ2	coenzyme Q2 homolog, prenyltransferase (yeast)	-1.84
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	-1.84
VPS18	vacuolar protein sorting 18 homolog (S. cerevisiae)	-1.84
HIST4H4	histone cluster 1, H4i; histone cluster 1, H4j; histone cluster 4, H4; histone cluster 1, H4h; histone cluster 1, H4i; histone cluster 1, H4j; histone cluster 1, H4i; histone cluster 1, H4d; histone cluster 1, H4c; histone cluster 1, H4f; histone cluster 1, H4e; histone cluster 1, H4b; histone cluster 1, H4a; histone cluster 2, H4a; histone cluster 2, H4b	-1.84
C6orf47	chromosome 6 open reading frame 47	-1.84
PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	-1.84
POLB	polymerase (DNA directed), beta	-1.83
DUSP22	similar to mitogen-activated protein kinase phosphatase x; dual specificity phosphatase 22	-1.83
PPP4C	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	-1.83
NOC3L	nucleolar complex associated 3 homolog (S. cerevisiae)	-1.83
FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	-1.83
SPOCD1	SPOC domain containing 1	-1.83
KIAA0649	KIAA0649	-1.83
CYP2A7	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 7	-1.83
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	-1.83
TRIM44	tripartite motif-containing 44	-1.82
MTMR6	myotubularin related protein 6	-1.82
F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	-1.82
TOMM22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	-1.82
ZNF529	zinc finger protein 529	-1.82
SLC37A4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	-1.82
MIPEP	mitochondrial intermediate peptidase	-1.82
VEZT	vezatin, adherens junctions transmembrane protein	-1.82
ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	-1.82
MRPL35	mitochondrial ribosomal protein L35	-1.82
EIF2AK4	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	-1.82
CYP2U1	cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1	-1.82

## Resultados

EV15L	ecotropic viral integration site 5-like	-1.82
PLS1	plastin 1 (1 isoform)	-1.82
KRTA P10-8	keratin associated protein 10-8	-1.81
SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	-1.81
SHARPIN	SHANK-associated RH domain interactor	-1.81
CANT1	calcium activated nucleotidase 1	-1.81
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	-1.81
TFF2	trefoil factor 2	-1.81
TRNS2	TRNS2; MTT52	-1.81
DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	-1.81
MICAL1	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	-1.81
LOC389053	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	-1.81
SMAD3	SMAD family member 3	-1.80
GUSB	glucuronidase, beta	-1.80
EPB41	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)	-1.80
PURA	purine-rich element binding protein A	-1.80
TRNW	trnW	-1.80
SLTM	SAFB-like, transcription modulator	-1.80
ARPC1A	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	-1.80
TMEM48	transmembrane protein 48	-1.80
NARG2	NMDA receptor regulated 2	-1.80
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	-1.80
MTF2	metal response element binding transcription factor 2	-1.80
FJX1	four jointed box 1 (Drosophila)	-1.79
GRB10	growth factor receptor-bound protein 10	-1.79
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	-1.79
REEP3	receptor accessory protein 3	-1.79
MYLK	myosin light chain kinase	-1.79
LOC151162	mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase; hypothetical LOC151162	-1.79
OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9	-1.78
PRR11	proline rich 11	-1.78
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10; hypothetical LOC646626	-1.78
MAMDC2	MAM domain containing 2	-1.78
CUL4B	cullin 4B	-1.78
IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	-1.78
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	-1.78
PSMC6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	-1.78
ZZZ3	zinc finger, ZZ-type containing 3	-1.77
HIPK1	homeodomain interacting protein kinase 1	-1.77
TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	-1.77
MXRA8	matrix-remodelling associated 8	-1.77
RHOU	ras homolog gene family, member U	-1.77
ITCH	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	-1.77
ACTR8	ARP8 actin-related protein 8 homolog (yeast)	-1.77
MXD3	MAX dimerization protein 3	-1.77
ZNF268	zinc finger protein 268	-1.77
CCDC14	coiled-coil domain containing 14	-1.77
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1.77
RAG1AP1	recombination activating gene 1 activating protein 1	-1.77
REXO1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)	-1.76
PCGF6	polycomb group ring finger 6	-1.76
C9orf5	chromosome 9 open reading frame 5	-1.76
TSSC1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	-1.76
CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A	-1.76
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-1.76
FRYL	FRY-like	-1.76
CNOT2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	-1.76
TMEM19	transmembrane protein 19	-1.76
C10orf18	chromosome 10 open reading frame 18	-1.76
BAX	BCL2-associated X protein	-1.75
NAB1	NGF-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	-1.75
TRNF	trnF	-1.75
POU1F1	POU class 1 homeobox 1	-1.75
PHKB	phosphorylase kinase, beta	-1.75
KIF3B	kinesin family member 3B	-1.75
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	-1.75
ATG4B	ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)	-1.75
RNA5EN	ribonuclease type III, nuclear	-1.75

## Resultados

PCDHGB7	protocadherin gamma subfamily B, 7	-1.75
LOC348162	hypothetical protein 348162	-1.74
	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa; hypothetical protein	
SNRPD1	LOC100129492	-1.74
BRPF3	bromodomain and PHD finger containing, 3	-1.74
DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23	-1.74
TRIM11	tripartite motif-containing 11	-1.74
FBXO2	F-box protein 2	-1.74
DHTKD1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	-1.74
BRCA2	breast cancer 2, early onset	-1.74
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	-1.73
TMEM65	transmembrane protein 65	-1.73
SAPS3	SAPS domain family, member 3	-1.73
TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3	-1.73
CHCHD1	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1	-1.73
PDAP1	PDGFA associated protein 1; similar to PDGFA associated protein 1	-1.73
PRDM4	PR domain containing 4	-1.73
SCAND1	SCAN domain containing 1	-1.73
PIK3R4	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	-1.73
RARG	retinoic acid receptor, gamma	-1.73
GMEB2	glucocorticoid modulatory element binding protein 2	-1.73
GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	-1.73
PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase-like	-1.73
MUC6	mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	-1.72
RNU86	RNA, U86 small nucleolar	-1.72
HDAC2	histone deacetylase 2	-1.72
ZFP90	zinc finger protein 90 homolog (mouse)	-1.72
CFC1	cripto, FRL-1, cryptic family 1	-1.72
MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-1.71
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1.71
SEPHS1	selenophosphate synthetase 1; similar to selenophosphate synthetase 1	-1.71
ZCCHC9	zinc finger, CCHC domain containing 9	-1.71
KLHL23	kelch-like 23 (Drosophila)	-1.71
ZBTB10	zinc finger and BTB domain containing 10	-1.71
PRMT5	protein arginine methyltransferase 5	-1.71
TSPAN5	tetraspanin 5	-1.71
	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2,	
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	-1.71
RDX	radixin	-1.70
C8orf40	chromosome 8 open reading frame 40	-1.70
CCDC77	coiled-coil domain containing 77	-1.70
CTSD	cathepsin D	-1.70
EXOC7	exocyst complex component 7	-1.70
DKFZP564M1416	DKFZP564M1416 protein	-1.70
TBC1D22A	TBC1 domain family, member 22A	-1.70
TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	-1.70
P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	-1.69
PLSCR4	phospholipid scramblase 4	-1.69
ATP6V1E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	-1.69
STS	steroid sulfatase (microsomal), isozyme S	-1.69
PKD2	polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	-1.69
CYBRD1	cytochrome b reductase 1	-1.69
SNX7	sorting nexin 7	-1.69
C22orf25	chromosome 22 open reading frame 25	-1.69
GUSBL2	glucuronidase, beta-like 2; glucuronidase, beta pseudogene	-1.69
NUP205	nucleoporin 205kDa	-1.69
TRBV21-1	T cell receptor beta variable 21-1 pseudogene	-1.69
CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1	-1.68
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	-1.68
OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	-1.68
ANP32E	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	-1.68
GPR110	G protein-coupled receptor 110	-1.68
IFT172	intraflagellar transport 172 homolog (Chlamydomonas)	-1.68
SYNJ1	synaptotagmin 1	-1.68
SMURF1	SMA3 specific E3 ubiquitin protein ligase 1	-1.68
NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	-1.68
GOLT1B	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)	-1.68
UHRF2	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2	-1.68
ADIPOR1	adiponectin receptor 1	-1.68
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	-1.68



## Resultados

AIM1	absent in melanoma 1	-1.67
BIN3	bridging integrator 3	-1.67
C16orf48	chromosome 16 open reading frame 48	-1.67
FBXL13	F-box and leucine-rich repeat protein 13	-1.67
TBL1X	transducin (beta)-like 1X-linked	-1.67
C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	-1.67
XPO4	exportin 4	-1.67
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	-1.67
RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	-1.66
BFAR	bifunctional apoptosis regulator	-1.66
TIMM9	translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)	-1.66
ERP29	endoplasmic reticulum protein 29	-1.66
PRKD2	protein kinase D2	-1.66
ZMPSTE24	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	-1.66
KCTD11	potassium channel tetramerisation domain containing 11	-1.66
NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	-1.66
TOR1A	torsin family 1, member A (torsin A)	-1.66
PET112L	PET112-like (yeast)	-1.66
STAMBPL1	STAM binding protein-like 1	-1.66
AQP12A	aquaporin 12A	-1.66
ARMCX1	armadillo repeat containing, X-linked 1	-1.65
CHM	choroideremia (Rab escort protein 1)	-1.65
STX7	syntaxin 7	-1.65
EXOC8	exocyst complex component 8	-1.65
KIAA1731	KIAA1731	-1.65
GFM1	G elongation factor, mitochondrial 1	-1.65
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	-1.65
LARP4	La ribonucleoprotein domain family, member 4	-1.65
VWA1	von Willebrand factor A domain containing 1	-1.65
PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	-1.65
MRPS15	mitochondrial ribosomal protein S15	-1.64
USP1	ubiquitin specific peptidase 1	-1.64
IL24	interleukin 24	-1.64
SNAI2	snail homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	-1.64
GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase,	-1.64
RP9	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	-1.64
LOC286059	retinitis pigmentosa 9 (autosomal dominant)	-1.64
RPS6KB1	hypothetical protein LOC286059	-1.64
MBTSP1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	-1.64
KIAA1033	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	-1.64
MPHOSPH6	KIAA1033	-1.64
MB	M-phase phosphoprotein 6	-1.64
GLUL	myoglobin	-1.64
LHFPL2	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	-1.64
PSMD13	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	-1.64
HSP90AA3P	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13	-1.64
ZNF184	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 3 (pseudogene)	-1.64
C3orf31	zinc finger protein 184	-1.64
DIP2A	chromosome 3 open reading frame 31	-1.64
PPM1B	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A ( <i>Drosophila</i> )	-1.63
CUL4A	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	-1.63
ZNF714	cullin 4A	-1.63
PSME3	zinc finger protein 714	-1.63
MYH10	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	-1.63
CYP1B1	myosin, heavy chain 10, non-muscle	-1.63
TRAPPC3	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-1.63
MATN2	trafficking protein particle complex 3	-1.63
COG6	matrilin 2	-1.62
JAGN1	component of oligomeric golgi complex 6	-1.62
PRRX2	jagunal homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	-1.62
CDK5	paired related homeobox 2	-1.62
PPHLN1	cyclin-dependent kinase 5	-1.62
EFCAB1	periplin 1	-1.62
VPS13B	EF-hand calcium binding domain 1	-1.62
DNAJB6	vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)	-1.62
GALC	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	-1.61
MAPK1	galactosylceramidase	-1.61
C21orf122	mitogen-activated protein kinase 1	-1.61
TBC1D7	chromosome 21 open reading frame 122	-1.61
	TBC1 domain family, member 7	-1.61

## Resultados

RBM17	RNA binding motif protein 17	-1.61
MRPL37	mitochondrial ribosomal protein L37	-1.61
BAHD1	bromo adjacent homology domain containing 1	-1.61
SLC35B1	solute carrier family 35, member B1	-1.61
GOLGA2	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	-1.61
CHRAC1	chromatin accessibility complex 1	-1.60
HBA1	hemoglobin, alpha 2; hemoglobin, alpha 1	-1.60
BSDC1	BSD domain containing 1	-1.60
GMFB	glia maturation factor, beta	-1.60
LRRCS6	leucine rich repeat containing 56	-1.60
KIAA0368	KIAA0368	-1.60
PLAC8	placenta-specific 8	-1.60
LYPLAL1	lysophospholipase-like 1	-1.60
C18orf21	chromosome 18 open reading frame 21	-1.60
SUFU	suppressor of fused homolog (Drosophila)	-1.60
SDCBP2	syndecan binding protein (syntenin) 2	-1.60
RAMP2	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2	-1.60
ITK	IL2-inducible T-cell kinase	-1.60
NFAM1	NFAT activating protein with ITAM motif 1	-1.60
CHMP5	chromatin modifying protein 5	-1.60
ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	-1.59
ADD3	adducin 3 (gamma)	-1.59
DYRK1A	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	-1.59
TRIM6	TRIM6-TRIM34 readthrough transcript; tripartite motif-containing 6; tripartite motif-containing 34	-1.59
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	-1.59
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	-1.59
GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 (beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase)	-1.59
CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	-1.59
C7orf23	chromosome 7 open reading frame 23	-1.58
GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	-1.58
PHF17	PHD finger protein 17	-1.58
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	-1.58
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-1.58
FZD1	frizzled homolog 1 (Drosophila)	-1.58
EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	-1.58
GOLGA8G	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8D; golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8C; similar to Golgin subfamily A member 8-like protein 1; golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8F; golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8G	-1.58
KIAA1958	KIAA1958	-1.58
NUBP2	nucleotide binding protein 2 (MinD homolog, E. coli)	-1.58
GREB1	GREB1 protein	-1.58
BSG	basigin (Ok blood group)	-1.58
UBE2F	ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)	-1.58
B3GNT7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7	-1.58
ZBTB33	zinc finger and BTB domain containing 33	-1.58
DEK	DEK oncogene	-1.58
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	-1.58
ZNF697	hypothetical LOC100130667; zinc finger protein 697	-1.58
FBXO41	F-box protein 41	-1.57
KIAA0664	KIAA0664	-1.57
LOC347549	hypothetical LOC347549	-1.57
SPCS3	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	-1.57
RIN3	Ras and Rab interactor 3	-1.57
GCC2	GRIP and coiled-coil domain containing 2	-1.57
NUP88	nucleoporin 88kDa	-1.57
ANLN	anillin, actin binding protein	-1.56
VPS54	vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae)	-1.56
SMARCD2	SW/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2	-1.56
TBC1D17	TBC1 domain family, member 17	-1.56
RB1	retinoblastoma 1	-1.56
HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	-1.56
SON	SON DNA binding protein	-1.55
YPEL5	yippee-like 5 (Drosophila)	-1.55
C12orf48	chromosome 12 open reading frame 48	-1.55
LOC90110	hypothetical protein LOC90110	-1.55
PRMT3	protein arginine methyltransferase 3	-1.55
FANCL	Fanconi anemia, complementation group L	-1.55

## Resultados

GAA	glucosidase, alpha; acid	-1.55
ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	-1.55
C17orf70	chromosome 17 open reading frame 70	-1.54
C1orf96	chromosome 1 open reading frame 96	-1.54
TGFBFR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	-1.54
CHORDC1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1; cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1 pseudogene	-1.54
AK3L1	adenylate kinase 3-like 2; adenylate kinase 3-like 1	-1.53
TRNM	TRNM; MTTM	-1.53
BTBD10	BTB (POZ) domain containing 10	-1.53
FADS2	fatty acid desaturase 2	-1.53
TRIM32	tripartite motif-containing 32	-1.53
MK167	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	-1.53
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	-1.53
NOL8	nucleolar protein 8	-1.53
TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	-1.53
LAMC2	laminin, gamma 2	-1.53
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosis)	-1.53
USP33	ubiquitin specific peptidase 33	-1.52
FAM54B	family with sequence similarity 54, member B	-1.52
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	-1.52
CD302	CD302 molecule; lymphocyte antigen 75	-1.52
PSEN2	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)	-1.52
SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	-1.52
SLK	STE20-like kinase (yeast)	-1.52
HAX1	HCLS1 associated protein X-1	-1.52
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	-1.52
FAM10A3	family with sequence similarity 10, member A3	-1.52
SAAL1	serum amyloid A-like 1	-1.52
CTAGE3	CTAGE family, member 3	-1.52
CENPE	centromere protein E, 312kDa	-1.52
DEPDC1	DEP domain containing 1	-1.51
ARTN	artemin	-1.51
STEAP3	STEAP family member 3	-1.51
LOC388237	hypothetical LOC388237	-1.51
CPT1B	choline kinase beta; carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	-1.51
ORC2L	origin recognition complex, subunit 2-like (yeast)	-1.51
SCP2	sterol carrier protein 2	-1.51
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	-1.51
GPBP1	GC-rich promoter binding protein 1	-1.51
CNIH3	cornichon homolog 3 (Drosophila)	-1.51
C3orf23	chromosome 3 open reading frame 23	-1.50
HIVEP1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	-1.50
LBR	lamin B receptor	-1.50
LOC440926	H3 histone, family 3B (H3.3B); H3 histone, family 3A pseudogene; H3 histone, family 3A; similar to H3 histone, family 3B; similar to histone H3.3B	1.50
MT1X	metallothionein 1X	1.50
ATF3	activating transcription factor 3	1.50
NDUFS5	similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase); NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	1.50
CLTA	clathrin, light chain (Lca)	1.51
RPS26P10	ribosomal protein S26 pseudogene 10	1.51
H3F3A	H3 histone, family 3B (H3.3B); H3 histone, family 3A pseudogene; H3 histone, family 3A; similar to H3 histone, family 3B; similar to histone H3.3B	1.51
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6; hypothetical protein	1.51
B2M	LOC100133042; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.51
NDUFC2	beta-2-microglobulin	1.51
SQSTM1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	1.51
RPS29	sequestosome 1	1.51
VDAC2	ribosomal protein S29 pseudogene 11; ribosomal protein S29 pseudogene 16; ribosomal protein S29 pseudogene 17; ribosomal protein S29 pseudogene 3; ribosomal protein S29 pseudogene 9; ribosomal protein S29	1.51
C21orf58	voltage-dependent anion channel 2	1.52
CNIH4	chromosome 21 open reading frame 58	1.53
DTX1	cornichon homolog 4 (Drosophila)	1.53
ANXA2P2	deltex homolog 1 (Drosophila)	1.53
CLIC1	annexin A2 pseudogene 2	1.55
	chloride intracellular channel 1	1.55

## Resultados

TMSL1	thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked	1.55
RPL37A	ribosomal protein L37a	1.56
SYT8	synaptotagmin VIII	1.57
CSTB	cystatin B (stefin B)	1.57
LOC342541	similar to TRIMCyp	1.57
MGC2752	hypothetical LOC65996	1.58
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1	1.58
IL1A	interleukin 1, alpha	1.59
HMGN2	hypothetical LOC729505; similar to hCG2040565; high-mobility group nucleosomal binding domain 2; similar to high-mobility group nucleosomal binding domain 2	1.59
SEC61G	Sec61 gamma subunit	1.59
ATF4	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67); activating transcription factor 4C	1.59
MAGEB6B	melanoma antigen family B, 6B pseudogene	1.59
DUPD1	dual specificity phosphatase and pro isomerase domain containing 1	1.59
ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.59
FBXO32	F-box protein 32	1.60
DUSP15	dual specificity phosphatase 15; chromosome 20 open reading frame 57	1.60
RPL3	ribosomal protein L3; similar to 60S ribosomal protein L3 (L4)	1.60
RPL39	ribosomal protein L39 pseudogene 10; ribosomal protein L39 pseudogene 20; ribosomal protein L39 pseudogene 27; ribosomal protein L39; ribosomal protein L39 pseudogene 13; ribosomal protein L39 pseudogene 32	1.61
AIF1	allograft inflammatory factor 1	1.61
VIM	vimentin	1.62
BRP44	brain protein 44	1.62
SF3B14	splicing factor 3B, 14 kDa subunit	1.62
NPC2	Niemann-Pick disease, type C2	1.62
TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	1.63
LOC440577	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21; hypothetical LOC100131044; similar to nucleophosmin 1; nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	1.63
RPLP2	ribosomal protein, large, P2 pseudogene 3; ribosomal protein, large, P2	1.63
ENO1	enolase 1, (alpha)	1.65
ANXA2P1	annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1	1.65
LOC134997	peptidylprolyl isomerase A processed pseudogene	1.66
KIAA1609	KIAA1609	1.67
FTHL2	ferritin, heavy polypeptide-like 2	1.67
TMEM14C	transmembrane protein 14C	1.68
PTMAP7	prothymosin, alpha pseudogene 7	1.68
RPS26	ribosomal protein S26 pseudogene 38; ribosomal protein S26 pseudogene 39; ribosomal protein S26 pseudogene 35; ribosomal protein S26 pseudogene 31; ribosomal protein S26 pseudogene 20; ribosomal protein S26 pseudogene 54; ribosomal protein S26 pseudogene 2; ribosomal protein S26 pseudogene 53; ribosomal protein S26 pseudogene 25; ribosomal protein S26 pseudogene 50; ribosomal protein S26 pseudogene 6; ribosomal protein S26 pseudogene 8; ribosomal protein S26	1.68
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1; ferritin, heavy polypeptide-like 3 pseudogene	1.68
CD63	CD63 molecule	1.68
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	1.68
LOC391532	similar to peptidylprolyl isomerase A	1.69
RPS8	ribosomal protein S8; ribosomal protein S8 pseudogene 8; ribosomal protein S8 pseudogene 10	1.69
HSP90AA2	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2; heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	1.70
OCIAD2	OCIA domain containing 2	1.70
PSMB1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	1.71
NPW	neuropeptide W	1.71
BRI3	brain protein I3; brain protein I3 pseudogene 1	1.72
ANAPC11	anaphase promoting complex subunit 11	1.72
TXNIP	thioredoxin interacting protein	1.72
COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2	1.74
PTMA	hypothetical LOC728026; prothymosin, alpha; hypothetical gene supported by BCO13859; prothymosin, alpha pseudogene 4 (gene sequence 112)	1.75
TPT1	similar to tumor protein, translationally-controlled 1; tumor protein, translationally-controlled 1	1.75
SIGLEC9	sialic acid binding Ig-like lectin 9	1.76
UQCRH	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein-like; ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1.76
S100A10	S100 calcium binding protein A10	1.76
RPLP1	ribosomal protein, large, P1	1.77

## Resultados

RPSA	ribosomal protein SA pseudogene 9; ribosomal protein SA pseudogene 8; ribosomal protein SA pseudogene 58; ribosomal protein SA pseudogene 19; ribosomal protein SA pseudogene 18; ribosomal protein SA; ribosomal protein SA pseudogene 15; ribosomal protein SA pseudogene 61; ribosomal protein SA pseudogene 29; ribosomal protein SA pseudogene 12	1.77
KIFC3	kinesin family member C3	1.77
OR7E24	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 24	1.78
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1.78
RPS11	ribosomal protein S11 pseudogene 5; ribosomal protein S11	1.78
PGAM4	phosphoglycerate mutase family member 4	1.79
RPL24	ribosomal protein L24; ribosomal protein L24 pseudogene 6	1.80
MT2A	metallothionein 2A	1.80
EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	1.81
TBCA	tubulin folding cofactor A	1.81
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	1.81
USP11	ubiquitin specific peptidase 11	1.81
RPL15	ribosomal protein L15 pseudogene 22; ribosomal protein L15 pseudogene 18; ribosomal protein L15 pseudogene 17; ribosomal protein L15 pseudogene 3; ribosomal protein L15 pseudogene 7; ribosomal protein L15	1.82
GRAMD1A	GRAM domain containing 1A	1.82
RPS27A	ribosomal protein S27a pseudogene 12; ribosomal protein S27a; ribosomal protein S27a pseudogene 11; ribosomal protein S27a pseudogene 16	1.82
RPL37	ribosomal protein L37	1.83
TMSL4	thymosin-like 4 (pseudogene)	1.84
RPL18	ribosomal protein L18	1.84
ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1.84
CALM2	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	1.84
SAA1	serum amyloid A1	1.85
C6orf48	chromosome 6 open reading frame 48; small nucleolar RNA, C/D box 52	1.86
KIRREL2	kin of IRRE like 2 (Drosophila)	1.86
TMSB10	thymosin beta 10	1.87
METTL1	methyltransferase like 1	1.88
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	1.91
MT1E	metallothionein 1L (gene/pseudogene); metallothionein 1E; metallothionein 1 pseudogene 3; metallothionein 1J (pseudogene)	1.91
HIF3A	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	1.92
PTTG1	pituitary tumor-transforming 1; pituitary tumor-transforming 2	1.93
NPM1	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21; hypothetical LOC100131044; similar to nucleophosmin 1; nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	1.93
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	1.95
PP1A3	similar to TRIMCyp; peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3	1.95
DTNB	dystrobrevin, beta	1.98
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1	1.98
NGEF	neuronal guanine nucleotide exchange factor	1.99
OR5BS1P	olfactory receptor, family 5, subfamily BS, member 1 pseudogene	1.99
RPS9	ribosomal protein S9; ribosomal protein S9 pseudogene 4	2.00
RPS13	ribosomal protein S13 pseudogene 8; ribosomal protein S13; ribosomal protein S13 pseudogene 2	2.00
RPS18	ribosomal protein S18 pseudogene 12; ribosomal protein S18 pseudogene 5; ribosomal protein S18	2.02
C18orf12	chromosome 18 open reading frame 12	2.02
RPL32	small nucleolar RNA, H/ACA box 7A; small nucleolar RNA, H/ACA box 7B; ribosomal protein L32	2.02
MT1JP	metallothionein 1L (gene/pseudogene); metallothionein 1E; metallothionein 1 pseudogene 3; metallothionein 1J (pseudogene)	2.02
MYCBP	c-myc binding protein	2.04
TSC22D1	TSC22 domain family, member 1	2.04
OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	2.05
RPL19	ribosomal protein L19; ribosomal protein L19 pseudogene 12	2.06
SUOX	sulfite oxidase	2.07
RPL9	ribosomal protein L9; ribosomal protein L9 pseudogene 25	2.10
RPL23A	ribosomal protein L23a pseudogene 63; ribosomal protein L23a pseudogene 75; ribosomal protein L23a pseudogene 37; ribosomal protein L23a pseudogene 65; ribosomal protein L23a pseudogene 43; ribosomal protein L23a pseudogene 44;	2.11
NPHS2	ribosomal protein L23a	2.11
IL24	nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)	2.13
	interleukin 24	2.13

## Resultados

SETD5	SET domain containing 5	2.14
TXN	thioredoxin	2.14
RPL4	ribosomal protein L4; ribosomal protein L4 pseudogene 5; ribosomal protein L4 pseudogene 4	2.15
BMP4	bone morphogenetic protein 4	2.15
LOC439953	similar to TRIMCyp; peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3	2.16
LOC401679	similar to filamin-binding LIM protein-1	2.17
RPS19	ribosomal protein S19 pseudogene 3; ribosomal protein S19	2.19
TMSB4X	thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked	2.20
SCAND1	SCAN domain containing 1	2.20
LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	2.21
MT1M	metallothionein 1M	2.22
PSTPIP1	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	2.22
LOC284688	hypothetical LOC284688	2.25
SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	2.25
RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	2.26
RPS3AP6	ribosomal protein S3a pseudogene 39; ribosomal protein S3a pseudogene 6; ribosomal protein S3a pseudogene 43; ribosomal protein S3a pseudogene 16; similar to 40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein); ribosomal protein S3a pseudogene 14; ribosomal protein S3a pseudogene 15; ribosomal protein S3a pseudogene 29	2.28
RPL27	ribosomal protein L27	2.29
LARP4	La ribonucleoprotein domain family, member 4	2.29
RPS12	ribosomal protein S12; ribosomal protein S12 pseudogene 4; ribosomal protein S12 pseudogene 11; ribosomal protein S12 pseudogene 9	2.30
RPL13A	ribosomal protein L13a pseudogene 7; ribosomal protein L13a pseudogene 5; ribosomal protein L13a pseudogene 16; ribosomal protein L13a; ribosomal protein L13a pseudogene 18	2.31
RPL27A	ribosomal protein L27a	2.32
RPS25	ribosomal protein S25 pseudogene 8; ribosomal protein S25	2.35
RPL35	ribosomal protein L35; ribosomal protein L35 pseudogene 1; ribosomal protein L35 pseudogene 2	2.38
RPL18A	ribosomal protein L18a pseudogene 6; ribosomal protein L18a	2.38
GLA	galactosidase, alpha	2.39
CDCP1	CUB domain containing protein 1	2.39
RPS3A	ribosomal protein S3A pseudogene 5; ribosomal protein S3a pseudogene 47; ribosomal protein S3a pseudogene 49; ribosomal protein S3A; hypothetical LOC100131699; hypothetical LOC100130107	2.39
PIPA	similar to TRIMCyp; peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3	2.40
UBC	ubiquitin C	2.42
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2.43
RPS10	ribosomal protein S10; ribosomal protein S10 pseudogene 4; ribosomal protein S10 pseudogene 11; ribosomal protein S10 pseudogene 22; ribosomal protein S10 pseudogene 7; ribosomal protein S10 pseudogene 13	2.44
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	2.45
DLEC1	deleted in lung and esophageal cancer 1	2.49
RPS17	ribosomal protein S17	2.50
RPS6	ribosomal protein S6 pseudogene 25; ribosomal protein S6; ribosomal protein S6 pseudogene 1	2.55
RPL36A	ribosomal protein L36a pseudogene 51; ribosomal protein L36a pseudogene 37; ribosomal protein L36a pseudogene 49; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H <sup>+</sup> ); ribosomal protein L36a	2.55
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 3; similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	2.58
LOC283050	hypothetical LOC283050	2.61
IER3	immediate early response 3	2.65
DUX1	double homeobox, 1	2.68
UGT2A1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1	2.70
TMSL6	thymosin-like 6 (pseudogene)	2.73
S100A6	S100 calcium binding protein A6	2.77
COX3	Cytochrome c oxidase subunit 3; ATP synthase subunit a; ATP synthase protein 8	2.82
VANGL1	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)	2.85
DPP9	dipeptidyl-peptidase 9	2.89
RPL6	ribosomal protein L6 pseudogene 27; ribosomal protein L6 pseudogene 19; ribosomal protein L6; ribosomal protein L6 pseudogene 10	2.92
ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase, type B	2.95
FTHL11	ferritin, heavy polypeptide-like 11	2.95

## Resultados

LOC284260	hypothetical gene supported by BC011527; BC021928; BC011527; BC021928	2.98
SNX6	sorting nexin 6	3.00
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	3.00
FTHL12	ferritin, heavy polypeptide-like 12	3.02
FTL	similar to ferritin, light polypeptide; ferritin, light polypeptide	3.03
LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	3.06
ARMC2	armadillo repeat containing 2	3.13
RPL41	ribosomal protein L41	3.14
C9orf3	chromosome 9 open reading frame 3	3.27
	ribosomal protein L7a pseudogene 70; ribosomal protein L7a; ribosomal protein L7a pseudogene 30; ribosomal protein L7a pseudogene 66; ribosomal protein L7a pseudogene 27; ribosomal protein L7a pseudogene 11; ribosomal protein L7a pseudogene 62	
RPL7A		3.32
OPTC	Opticin	3.34

La tabla 13 muestra los genes modulados en las células MDA-MB-231 por efecto de la transfección del miR-944, se aprecia el símbolo del gen, seguido del nombre del gen y la tasa de valor de cambio (FC).

**Tabla 14. Genes modulados por miR944 en células MDA-MB-231 que participan en migración e invasión.**

Simbolo del gen <sup>a</sup>	Nombre	Valor de cambio	Función del gen relacionada a cáncer	Referencia	Sitios de unión al miR-944 <sup>b</sup>
PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	-3.03	Pak1 interactua y fosforila la histona H3 lo cual influye en los eventos mitoticos en cancer de mama.	175	1
PRKCA	Protein kinase C, alpha	-1.96	PKCalfa puede regular la actividad de Ets1 en células de cáncer de mama invasivas	176	1
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	-1.61	Vía de señalización crucial para el crecimiento de los tumores estrogeno dependientes promoviendo su crecimiento en los estados tempranos de la progresión tumoral.	177	1
CAMK2G	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	-2.60	CAMK2G juega un papel critic en el crecimiento del osteosarcoma. Su inhibición puede ser una estrategia terapéutica atractiva para combatir el osteosarcoma de alto grado en niños.	178	1
NIPBL	Nipped-B homolog (Drosophila)	-2.77	La supresion de sus homologos resulta en inestabilidad chromosomal y defectos en la cohesión de cromatidas en células de cáncer colorectal.	179	1
PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IV A, member 1	-1.80	Células de adenocarcinoma de colon tienen la habilidad de producir las proteínas PTP4A1, PTP4A2 y PTP4A3, las cuales se relacionan con metástasis a los nódulos linfáticos.	180	1
CDCP1	CUB domain containing protein 1	2.39	CDCP1 promueve la invasion y la diseminación peritoneal de las células del cancer a través de la regulación de la migración y el anclaje independiente.	181	1
MMP14	Matrix metalloproteinase 14	-2,30	MMP14 es una enzima proteolítica fundamental en el control de la invasividad de las células de cáncer de mama. Es altamente expresada en tumores mamarios agresivos y se asocia con un mal pronóstico.	182	1
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)	-1,81	La expresión de TFRC es atenuada es atenuada en las células pulmonares asociándose a la agresividad.	183	1
TRIM32	Tripartite motif-containing 32	-1,53	TRIM32 es un nuevo oncogen que promueve el crecimiento tumoral, la metastasis y la resistencia a las terapias anticancerígenas.	184	1



## Resultados

ADAM28	ADAM metallopeptidase domain 28	-3,05	ADAM28 es sobreexpresado en una forma activa en células de carcinoma mamario y es implicado en la proliferación a través de del IGF-I.	185	0
ANXA7	Annexin A7	-2,67	La disminución en la expresión de ANXA7 fue asociada con el potencial invasivo en tumores de alto grado de multiples tumores. Las metastasis a los nodulos linfáticos provenientes de otros sitios como mama y próstata tienen una expresión deficiente de ANXA7.	186	0
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	-1,67	BARD1 actua en la apoptosis de modo p53-dependiente. Mutaciones de BARD1 en células germinales has sido detectadas en cancer de mama y ovario hereditario negativo para alteraciones enBRCA1 y BRCA2.	187	0
BAX	BCL2-associated X protein	-1,75	Defectos en BAX han sido encontrados en células T de leucemia linfoblástica aguda, linfoma de burkitt y plasmacitoma. La apoptosis inducida por el antagonista del receptor de prolactina humana es mediada a través de la regulación de la expresión de Bax y Bcl-2.	188	0
BRCA2	Breast cancer 2, early onset	-1,74	Los defectos en BRCA2 son causa de la suceptibilidad genética a cáncer de mama.	189	0
CCNE2	Cyclin E2	-2,66	Estudios muestran que CCNE1 y CCNE2 son marcadores de pronóstico independientes para los pacientes con nodos linfáticos negativos, y CCNE1permite subclasificar a los pacientes.	190	0
CHEK2	Protein kinase CHK2-like	-2,01	La mutación es asociada con cáncer hereditario.	191	0
CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1	-1,68	El transcrito de CRTC1 es detectado en conjunto con MAML2. CRTC1 es detectado en baja concentración, mientras que MAML2 es detectado como sobreexpresado en carcinomas mucoepidemales de alto grado. La detección de estos genes en ese equilibrio corresponde a carcinomas agresivos.	192	0
CTSD	Cathepsin D	-1,70	La Catepsina D es crucial para el crecimiento de fibroblastos invasivos y puede actuar como interlocutor entre las células canceriogenas and estromales independientemente de su actividad catalítica.	193	0
DEK	DEK oncogene	-1,58	DEK juega un papel importante en la carcinogenesis cervical y tiene un potencial para ser herramientas de diagnóstico y terapia.	194	0
DLEC1	Deleted in lung and	2,49	Los defectso en DLEC1 estan relacionados con el desarrollo del cáncer de mama.	195	0

## Resultados

	esophageal cancer 1		Puede actuar como supresor de tumor al inhibir la proliferación.		
E2F3	E2F transcription factor 3	-2,27	Los niveles de E2F3 tienen un rol crítico en la modulación de la tasa de proliferación en cáncer de riñón y próstata.	196	0
ENO1	Enolase 1, (alpha)	1,65	ENO1, junto con IL8 y DES son genes clave en la susceptibilidad en cáncer y modulan la biosíntesis de proteínas en la tumorigénesis de cáncer de colon.	197	0
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	-3,01	FGFR2 es un oncogen en células mamarias epiteliales humanas. En las células de cancer de mama puede haber amplificación del gen FGFR2.	198	0
FES	Feline sarcoma oncogene	-1,86	FES ha sido encontrado reprimido por un mecanismo de metilación en el promotor en células de cáncer colorectal.	199	0
GREB1	GREB1 protein	-1,58	GREB 1 es involucrado en el crecimiento de células humanas mamarias inducido por estrógenos. Es un marcador potencial de respuesta y un potencial blanco terapéutico.	200	0
LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	-2,19	Los tumores mamarios con una expresión baja de LATS1 y LATS2 tienen un fenotipo agresivo causado por hipermetilación de los promotores de esos genes.	201	0
LEPR	Leptin receptor	-1,89	Leptin estimula de manera significativa la proliferación de la línea de células mamarias tumorales T47-D.	202	0
MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-2,07	MAD1 es un gen que puede funcionar con un supresor de tumor y la represión de este gen contribuye a la tumorigénesis en cáncer de estómago.	203	0
NCOA4	Nuclear receptor coactivator 4	-2,34	NCOA4 promueve el crecimiento y la invasión celular y su expresión es incrementada en cáncer de próstata.	204	0
NEDD4	Neural precursor cell expressed, developmentall y down-regulated 4	-2,33	NEDD4-1 ha sido encontrado como sobreexpresado en células malignas gástricas y colorectales y se ha sugerido que la expresión de NEDD4-1 se asocia con el desarrollo de cáncer gástrico y colorectal.	205	0
NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	-3,09	Nek2 es sobreexpresada de modo significativo en carcinomas preinvasivos y carcinomas ductales <i>in situ</i> de mama. Es un blanco potencial de tratamiento en cáncer de mama.	206	0
NOTCH2	Notch	-1,58	Akt-1 ha sido encontrado en tumores receptor de estrógenos positivo bien	207	0

## Resultados

	homolog2		diferenciados y sin invasión a nodulos linfáticos, pero su expresión se pierde en tumores con invasión a nódulos linfáticos. Lo que sugiere la participación de Notch en la progresión del cáncer de mama.		
PBX1	Pre-B-cell leukemia homeobox 1	-3,17	El complejo PBX1-HOXC8 se asocia al crecimiento independiente de andrógenos en cáncer de próstata. La pérdida del gen PLZF, resulta en la sobreexpresión de PBX1 y HOXC8.	208	0
RBL2	Retinoblastom a-like 2 (p130)	-2,71	RBL2 (p130) tiene un rol compensatorio a la pérdida del gen RB. Participa en la senescencia por arresto celular en líneas de cáncer de mama en respuesta aldaño al DNA.	209	0

La tabla muestra los genes modulados en las células MDA-MB-231 por efecto de la transfección del miR-944, que están implicados en los procesos de migración e invasión, se aprecia el símbolo del gen, seguido del nombre del gen, la función del gen en el cáncer y la cantidad de los sitios de unión del miR-944.

### 13. El miR-944 modula la migración en líneas celulares mamarias.

Dado el potencial papel del miR-944 en la regulación de la migración e invasión celular tanto por sus blancos predichos, así como por los genes modulados en el microarreglo, es consecuente analizar el efecto del miR-944 en la migración celular.

Para ello evaluamos el efecto de la expresión del miR-944 en la migración celular a través del ensayo Wound-healing. Este ensayo consiste en evaluar la restauración de la monocapa celular cuando esta es parcialmente destruida mediante un trazo fino. Si el miR-944 tiene efecto en la migración, la restauración de la monocapa será nula o más lenta respecto al control.

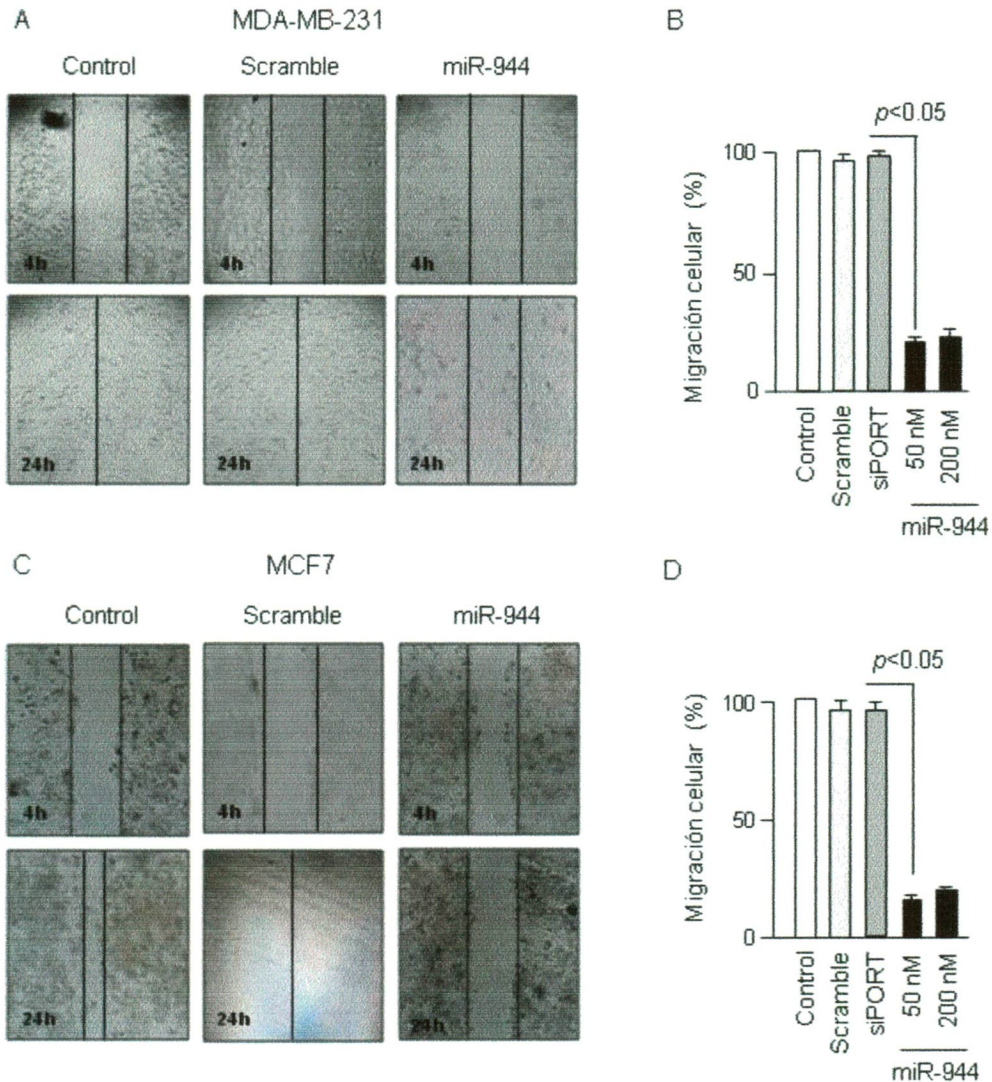
De manera inicial, células MCF-7 y MDA-MB231 transfectadas con 50 nM del precursor miR-944, células tratadas con el agente transfectante y células sin transfectar fueron analizadas en este ensayo. Los resultados muestran una clara recuperación de la monocapa en la condición normal la cual fue considerada como el 100%. En contraste dicha migración fue reducida por efecto de la transfección del miR-944 en un 90% para el caso de las células MDA-MB-231 y en un 80% en el caso de las células MCF-7. De manera importante el efecto inhibitorio de la migración no fue dependiente de la concentración del precursor (Fig. 17 B). La representación gráfica de estos porcentajes se encuentra en la figura 19 C.

Con el objeto de corroborar estos resultados, la migración fue evaluada con cámaras transwell acorde a lo descrito en metodología. El número de células que migraron a la parte inferior de la cámara en la condición control fue considerado como el 100%. Las células transfectadas con el scramble y en presencia del agente transfectante no muestran diferencias estadísticas significativas en la migración respecto del control en ninguna de las líneas celulares. En contraste, las células transfectadas con el precursor del miR-944 a 50 nM y 200 nM mostraron una reducción en la migración entre un 70-75% y un 80-85% en células MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente. Considerando de manera conjunta estos datos concluimos que el miR-944 modula la migración celular *in vitro*.

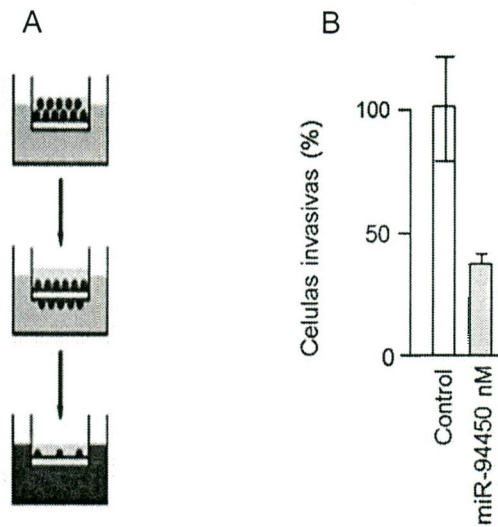
#### **14. La expresión del miR-944 en células MDA-MB-231 inhibe la invasión celular.**

La serie de experimentos realizados anteriormente demostraron la participación del miR-944 en la migración celular y dado que la invasión es otro proceso posiblemente afectado por el miR-944, evaluamos el efecto de la transfección del miR-944 en la invasión celular. Para ello la línea celular MDA-MB-231 fue transfectada con 50 nM del pre-miR-944 y sometida al análisis de migración en cámaras transwell acorde a lo descrito en metodología. Este ensayo se basa en el principio de que las células con capacidad invasiva como la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, secretan proteasas que les permiten degradar la matriz extracelular y atravesar la lámina basal. En este

caso, las cámaras transwell son preparadas con una capa de matrigel (matriz proteica) que simula la matriz extracelular y que será degradada por proteasas excretadas por las células con capacidad invasiva. Si el miR-944 tiene un efecto negativo en la invasión, las células MDA-MB-231 transfectadas serán incapaces de degradar la matriz y migrar al pozo inferior. Como se aprecia en la figura 20, la invasión celular en las células transfectadas con el pre-miR-944 fue reducida en un 60% en comparación con las células MDA-MB-231 sin transfectar. Este análisis demostró que el miR-944 no sólo suprime la migración sino también la invasión celular.



**Figura 20. El miR-944 modula la migración celular *in vitro*.** La figura muestra el efecto de la transfección del miR-944 en la migración celular de las células MCF7 y MDA-MB-231, evaluada con ensayos wound heal y transwell. Paneles superiores células MCF7, inferiores MDA-MB-231. (A) y (C) Ensayo wound heal. Las células MCF7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas con el pre-miR-944 (50 nM). 48 horas pos-transfección la monocapa fue rasgada y evaluada a las 4 y 24 horas para estimar la restauración. (B) y (D) Ensayo de migración en cámaras transwell. Las células MCF7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas con el pre-miR-944 (50 nM). 48 horas pos-transfección las células fueron sembradas en cámaras transwell y 24 horas después las células que migraron al pozo inferior fueron contabilizadas. El número de células que llegaron al pozo inferior en el control (sin transfectar) corresponde al 100% de migración celular.



**Figura 21. El miR-944 reprime la invasión celular *in vitro*.** La figura muestra la disminución en la invasión celular de la línea celular MDA-MB-231 por efecto de la expresión del miR-944. Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con el pre-miR-944 (50 nM). 48 horas pos-transfección las células fueron sembradas en cámaras transwell con una base de matrigel. 24 horas después las células que lograron atravesar la matriz de gel y llegaron al pozo inferior fueron cuantificadas. El número de células que migro en la condición control (transfectadas con moléculas scramble) fue considerado como el 100%. (A) Representación gráfica del proceso de invasión evaluado en cámara transwell. (B) Inhibición de la invasión celular por efecto de la transfección del miR-944 en células MDA-MB-231.

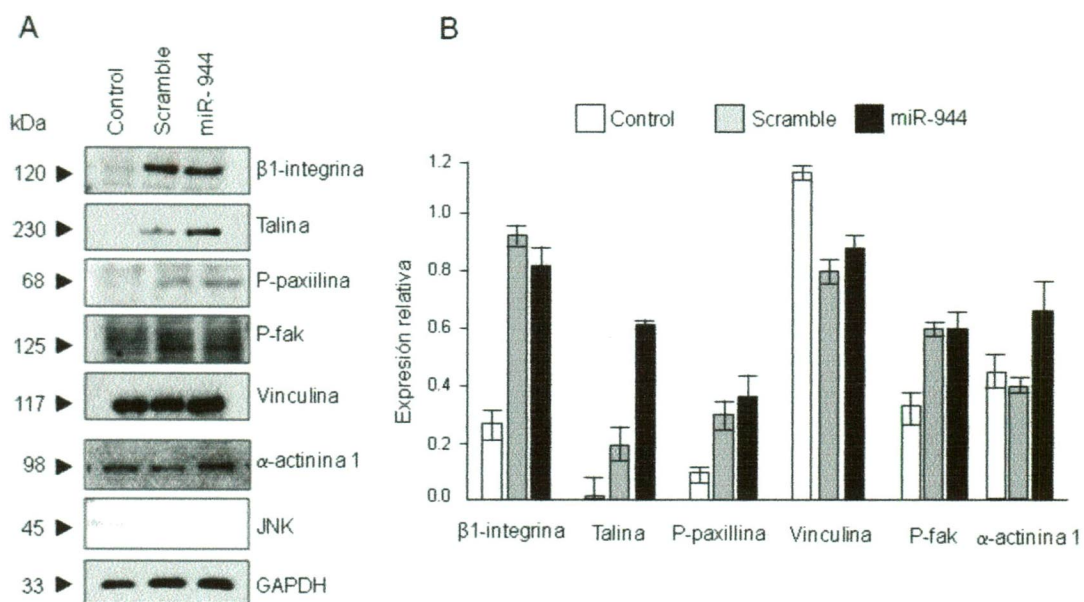


### **15.- La expresión del miR-944 induce cambios en la expresión de las proteínas de adhesión focal.**

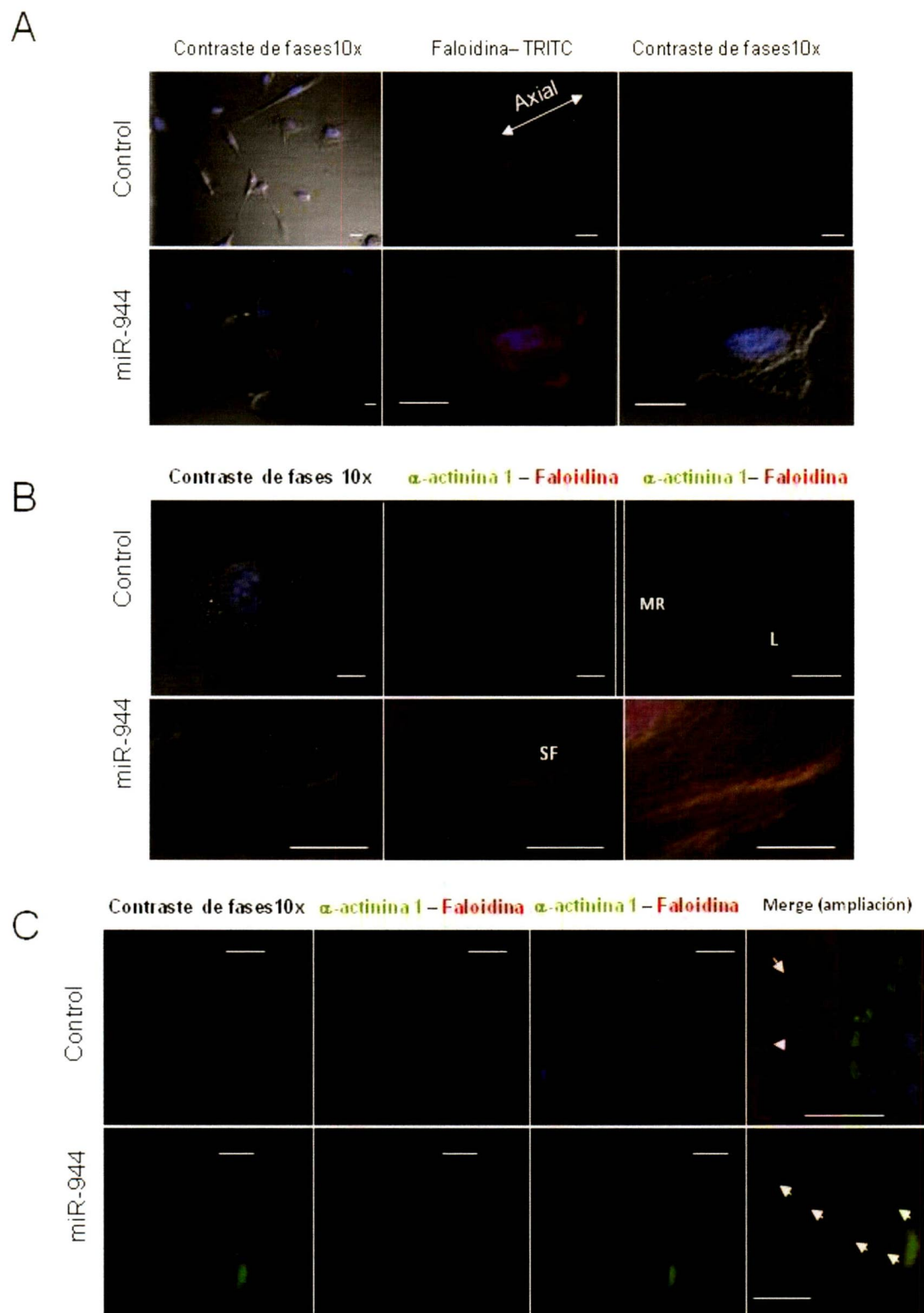
Los experimentos realizados con anterioridad evidencian la inhibición de la migración e invasión mediada por miR-944 en las células MDA-MB-231 por un mecanismo aún desconocido. Las distintas aproximaciones de genes modulados por el miR-944 (blancos predichos y genes modulados en el microarreglo) muestran diversas proteínas con participación en la regulación de la formación de filopodios, lamelipodios y adhesión focal (complejos proteicos asociados a la migración e invasión), necesarios en la metástasis. Tomando como referencia estos eventos se utilizó un panel de anticuerpos contra las proteínas que participan en la adhesión focal tales como  $\beta$ 1-integrina, talina, p-paxilina, p-fak, vinculina y  $\alpha$ -actinina 1, así como el factor de transcripción JNK que induce la producción de proteasas de matriz celular. A través de ensayos Western blot encontramos que la expresión del miR-944 aumenta hasta cuatro veces la expresión de las proteínas  $\beta$ 1-integrina, paxilina, talina y  $\alpha$ -actina 1 (figura 22).

Esto sugiere que los complejos de adhesión focal pierden la dinámica de ensamble/deseensamble y son estabilizados inhibiendo así el proceso de migración. Para probar esta hipótesis se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 transfectadas con el precursor del miR-944 dirigido contra las proteínas  $\alpha$ -actinina 1, vinculina y paxilina. Estas últimas son las principales proteínas del complejo de adhesión focal, además de

ser las más abundantes en el mismo. Los resultados de la inmunofluorescencia mostraron que las células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944, muestran una distribución  $\alpha$ -actinina 1 uniforme en todo el cuerpo celular, con múltiples puntos de contacto con el citoesqueleto de actina lo que conlleva a un fortalecimiento de la adhesión focal (figura 23C). Así mismo, las células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-944 perdieron la forma alargada asociada con la movilidad en células mesenquimales y adoptaron una forma concéntrica y despolarizada (figura 23A). Es importante destacar que la adquisición de esta forma concéntrica fue acompañada de la pérdida de las estructuras de actina y la presencia de fibras de estrés irregulares. La disposición del citoesqueleto de actina también cambió drásticamente, pasando de una organización axial en las células MDA-MB-231 control (figura 20A) a una distribución radial en células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944 (figura 23A ). En resumen, los resultados de la inmunofluorescencia mostraron la estabilización de los complejos de adhesión focal que fueron evidenciados mediante la localización de la proteína  $\alpha$ -actina 1. Esta proteína es clave en el complejo de adhesión focal sirviendo como puente entre la talina y vinculina.



**Figura 22. El miR-944 modula la expresión de proteínas de adhesión focal.** La figura muestra el efecto de la expresión del miR-944 en la expresión de las proteínas  $\beta 1$ -integrina, talina, p-paxilina, p-fak, vinculina, actinina y JNK. Células MDA-MB-231 control y tranfectadas con 50 nM del pre-miR-944 fueron lisadas a las 48 horas post-transfección. 50 microgramos de las proteínas fueron sometidas a electroforesis y transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar los ensayos Western blot acorde a lo descrito en metodología. Los resultados de estos ensayos fueron analizados mediante densitometría y normalizados con base en la expresión del control de carga GAPDH. (A) Ensayos western blot contra las proteínas del complejo de adhesión focal. (B) Valores normalizados de densitometría correspondiente a los resultados en el panel A.



**Figura 23. El miR-944 reduce la migración e invasión a través de la estabilización de las adhesiones focales.** Las células MDA-MB-231 control y transfectadas con el miR-944 fueron incubadas con faloidina rodamina para la visualización de la F-actina (rojo), anticuerpos  $\alpha$ -actinina1 (verde) y la contratinción con DAPI (azul). (A) Organización del esqueleto de actina en células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-944. Las imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia, revelan en las células MDA-MB-231 control una morfología alargada y la organización del citoesqueleto axial mientras que las células que expresan el miR-944 adoptan una morfología radial mostrando una difusión en la distribución de la actina cercana a la periferia de la célula. (B) Visualización de las estructuras relacionadas con la adhesión celular. Las imágenes muestran en las células MDA-MB-231 control, la organización de la actina que muestra ondulaciones de la membrana (MR), principalmente filopodios ramificados y salientes (F). Las células MDA-MB-231 que expresan el miR-944 presentan la aparición abrupta de las fibras de estrés (SF) y en color amarillo los puntos focales maduros entre  $\alpha$ -actinina1 y el citoesqueleto de actina. (C) Distribución celular de  $\alpha$ -actinina1. Las imágenes confocales X-Z de  $\alpha$ -actinina1 (verde) en células MDA-MB-231 control, muestran una señal difusa y baja sin colocalización con el esqueleto de actina a pesar de observar los invadopodios incipientes. Mientras que en las células transfectadas con el pre-miR-miR944 se aprecia una fuerte señal puntiforme de  $\alpha$ -actinina1 con la presencia de múltiples adherencias focales a toda la periferia de la célula. Las flechas señalan los invadopodios y las puntas de flecha indican las adhesiones focales. Bara=10 micras.

## 16. El miR-18b se sobreexpresa en tumores mamarios y líneas celulares de cáncer de mama.

Acorde a los resultados de predicción de blancos predichos y rutas de señalización potencialmente afectadas, el miR-18b es otro miRNA que tiene la capacidad de modular genes importantes en migración y metástasis. Este miRNA se localiza en el cromosoma X dentro del clúster miR-106a-363 constituido por los miRNAs miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2 y miR-363 (miRbase). Diversos reportes asocian la expresión aberrante del miR-18b a diversas patologías humanas incluyendo hipertrofia cardiaca, esclerosis múltiple e infección crónica del virus de la hepatitis B <sup>210-212</sup>. El miR-18b es sobreexpresado en cáncer gástrico, epitelial, colon y tumores benignos de ovario <sup>213-216</sup>. Algunos genes como NOTCH2, NEDD9 and MEKK1 han sido identificados como blancos del miRNA-18b <sup>(217)</sup>. En cancer de mama miR-18b regula negativamente la señal del receptor  $\alpha$  de estrógenos <sup>218</sup>. En otros estudios, la baja expresión del miR-18b fue asociada con una baja supervivencia en tumores Her2 negativos, aunque esto no correlaciona con los niveles del receptor  $\alpha$  de estrógenos <sup>219</sup>. Recientemente, los altos niveles del miR-18b circulante fueron propuestos como un potencial marcador de cáncer de mama <sup>220</sup>. Aunque el conocimiento sobre el miR-18b ha ido aumentando, las funciones fisiológicas del miR-18b aun no han sido claramente establecidas y el número de blancos validados de este miRNA es escaso.

## Blancos predichos del miR-18b (TargetScan)

NEDD9	ADD3	HEG1	C13orf30
GLRB	KCNJ2	NXT2	PIAS3
INADL	UQCRB	LSM14B	FOSL2
PHC3	RUNX1	PAPPA	LAT
ESR1	HIF1A	FAM130A2	LIN28
KCNA1	ENC1	ODZ3	MYO1C
TMEM170B	ZFP62	NR3C1	EHMT1
DICER1	SORBS2	SATB1	ZC3H12C
HMGCS1	XYLT1	ZBTB47	HMG20B
ATM	TNRC6B	TRIOBP	ZBTB44
FAM3C	PTP4A3	LMO4	UBE2G1
THEX1	KIAA0999	RAB5C	NKTR
HEATR5A	KLHL20	DIP2C	GIGYF2
FBXL3	SLC12A6	FLJ20309	MTF1
EPB41L1	SMAP2	BHLHB5	ANKRD52
ZNF367	UBTD2	TRIM2	IGSF3
CREBL2	ETV6	C1orf9	CANX
TMEM2	TBPL1	SLC6A6	DUSP16
MAP3K1	MDGA1	CAMKK2	ZNF618
CDC2L6	CTGF	CTDSPL	DSC3
ATXN1	RNF4	BTBD14B	NAV1
LOC203547	CRIM1	USP24	
PDE4D	RABGAP1	C7orf42	
RAB11FIP2	TNFAIP3	ANK3	
PAR6B	FAM73A	C1orf21	
KIAA1012	FRYL	SLC35E1	
SH3BP4	ORA3	FCHSD2	
ESCO2	CADM2	NIP30	
LRRFIP1	MBOAT2	RGS4	
CCND2	KIAA1553	CLCN4	
MAP7D1	ABTB2	NR1H2	
TTPAL	MARCH5	ZCCHC4	
HMBOX1	SMAD2	ALCAM	
STAM2	FBNP1	TEX2	
ZCCHC3	BRWD3	ANKRD50	
GCLC	PCMTD2	LIN54	
NCOA1	NOTCH2	MEF2D	
MAPK4	IGF1	ATP13A1	
MYLK	PSD3	ZNF704	
GIGYF1	C5orf30	CCDC88A	
DAAM2	ASXL2	STK4	
KCNH7	C6orf225	KCTD16	
DIRAS2	BTG3	TRIB2	
XYLT2	GIT2	CDK2	
THBD	OLFML2B	NFAT5	
NEDD4	RAB22A	UBE2Z	
PTGFRN	AEBP2	ADAT2	
KCMF1	JARID1B	ATXN2L	
PHF19	NUFIP2	IGF2BP2	
CNTNAP1	ZBTB4	ATP8A1	
IRF2	FNDC3B	FAM80A	
PDZD2	CDC42	ZAK	
SIM2	PHF2	C5orf13	
CLCC1	ATXN7L1	ROBO2	
KPNA6	FRS2	RCOR1	
ANKRD13C	MBNL1	KIT	

### Blancos validados

Simbolo	Nombre	Referencia
NOTCH2	Notch Homolog 2	2b17
NEDD9	Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 9	217
MEKK1	(MAP3K1) Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1, E3 Ubiquitin Protein	217

### Secuencia del miR-18b

>hsa-mir-18b MI0001518

```
UGUGUUAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAGUGAAGCAGCUUAGAAUCUACUGCCCUAAAUG
CCCUUCUGGCA
```

### Stem-loop

```
ug      --   u   c   u       ua  --g
  uguua  agg gcau uag gcagu  gu   aagc
  |||||  |||  ||||  |||  |||||  ||   ||| a
  acggu  ucc cgua auc  cguca  ua   uucg
--      cu   c   a   c       uc  aga
```

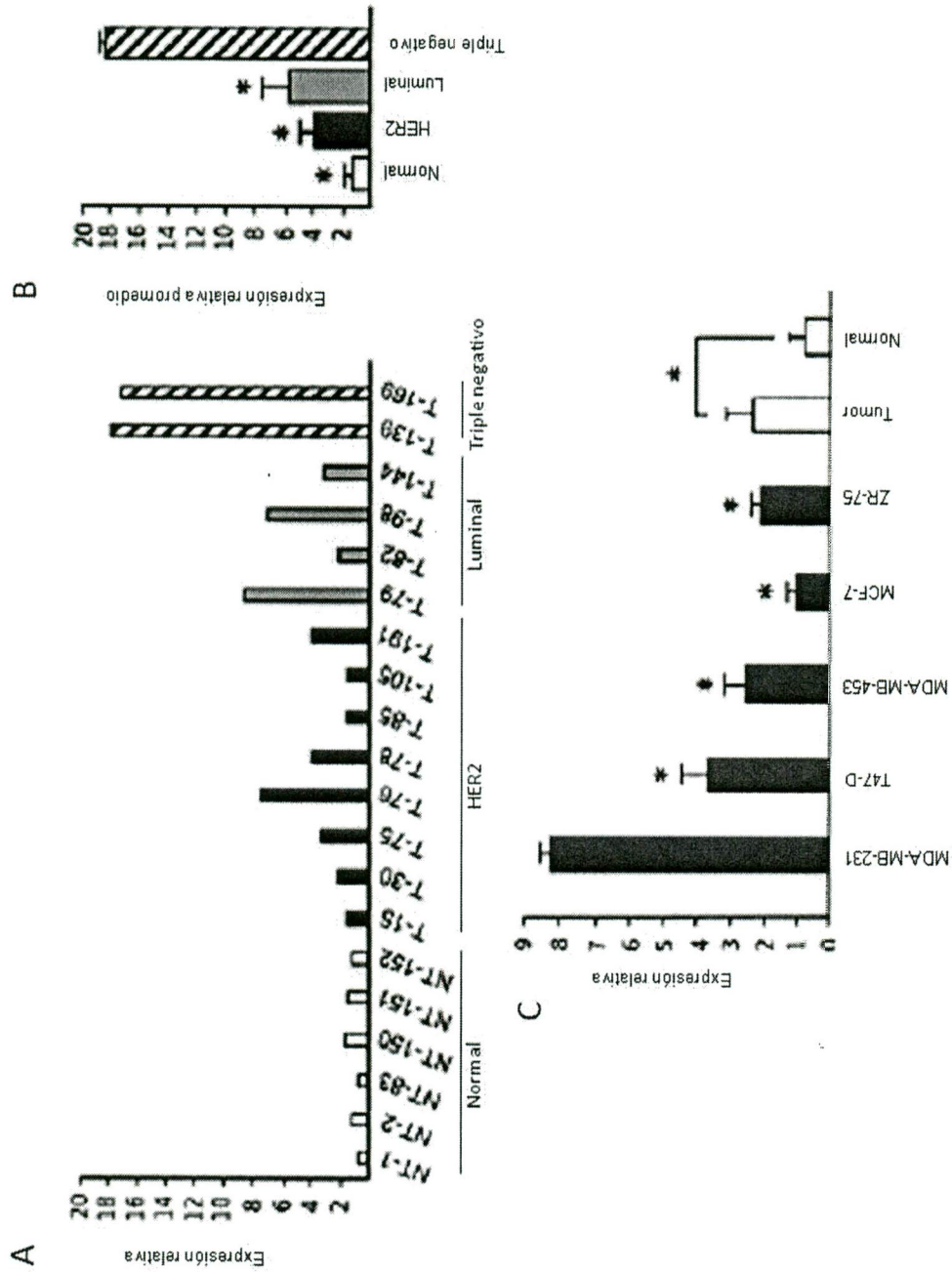
Con base en estos antecedentes y los resultados de las predicciones bioinformaticas, se evaluó la expresión relativa del miR-18b en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75 y T47D, así como en tejidos mamarios normales y tumorales mediante qRT-PCR.

Los resultados muestran que en los tumores analizados el miR-18b se sobreexpresa (fold change 2-18) en comparación con el tejido mamario normal y que entre los distintos subtipos clínicos analizados, el triple negativo mostro la



mayor expresión del miR-18b (figura 24A). En el caso de las líneas celulares la mayoría de ellas sobreexpresa el miR-18b (entre 2-9 veces) en comparación con el tejido mamario normal, siendo la línea celular MDA-MB-231 la de mayor expresión (fold change 9). En contraste, la línea celular MCF-7 mantiene una expresión similar a la encontrada a la de los tejidos mamarios normales (figura 24C).

Para evaluar el efecto celular de la represión del miR-18b, se eligió como modelo celular la línea MDA-MB-231. Esto se hizo considerando que la línea celular MDA-MB-231 mostró la mayor expresión del miR-18b entre todas las líneas celulares (figura 24A), lo que sugiere que una reducción en su expresión podría tener un efecto celular evidente que permita inferir la función del miRNA. En adición a esto, miR-18b ya ha sido previamente asociado a la migración e invasión celular en glioblastoma<sup>167, 217</sup>, lo que implica que en cáncer de mama el miR-18b podría modular estos eventos de manera similar. Esta hipótesis se sustenta al considerar los resultados de predicción de blancos y rutas afectadas por el miR-18b, los cuales muestran la posible regulación de proteínas que



**Figura 24. Expresión del miR-18b en líneas celulares de cáncer de mama y biopsias tumorales.** La figura muestra la expresión del miR-18b en biopsias y líneas celulares mamarias. La expresión del miR-18b en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB453, ZR-75 y T47D y de 40 tumores mamarios, así como de tejido mamario normal fue analizado mediante RT-PCR, los valores fueron normalizados con base a la expresión de los RNU-44 y RNU-48. (A) Expresión del miR-18b en tumores mamarios y tejido mamario normal. (B) Representación gráfica del promedio de la expresión relativa de los tumores en A. (C) Comparativo de la expresión del miR-18b en las líneas celulares mamarias y el tejido mamario normal.

regulan el proceso de migración e invasión celular, tales como CDC42, HIF1A, PIAS3, IGF1, SMAD2, KIT, RUNX1, STK4 y CDK2. Finalmente, una de las características más reconocidas de la línea celular MDA-MB-231 es su alta capacidad invasiva, lo cual correlaciona con la alta expresión encontrada del miR-18b, por lo cual decidimos evaluar el efecto de la represión de este miRNA en estos procesos celulares.

#### **17. La represión del miR-18b no afecta la viabilidad celular.**

Con la finalidad de determinar la participación del miR-18b en la viabilidad celular se realizaron transfecciones en células MCF-7 y MDA-MB-231 con el inhibidor de este miRNA, en concentraciones de 25-200 nM. La viabilidad celular fue evaluada mediante ensayos MTT. El valor obtenido de las células control (sin transfectar) fue considerada como el 100%. Los resultados indican que la transfección de la molécula scramble y la inhibición del miR-18b no tienen efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad celular en comparación con las células control. Esta misma ausencia de efecto sobre la viabilidad celular es apreciable aún en concentraciones crecientes del inhibidor del miR18b.

#### **18. Búsqueda de genes modulados por el miR-18b mediante microarreglos de expresión.**

Con el fin de evaluar los cambios en la expresión génica en la línea celular MDA-MB-231, causados por la inhibición del miR-18b, se realizó la

hibridación en microarreglos del RNA total proveniente de células transfectadas con 50 nM del inhibidor y células sin transfectar. Los resultados mostraron la regulación de 263 genes (43 genes reprimidos y 220 sobreexpresados). Al considerar los genes modulados por el miR-18b y realizar un análisis de enriquecimiento con el programa DAVID, encontramos que los genes se agrupan en procesos biológicos tales como la transducción de señales por proteínas acopladas a proteínas G (35%), procesos neurológicos (30%), percepción y cognición (30%), respuesta inmune y procesos metabólicos (5%). La tabla 15 muestra los genes sobreexpresados y reprimidos por efecto de la transfección del inhibidor del miR-18b. Inesperadamente, evidenciamos la sobreexpresión de 55 genes de receptores olfatorios (RO) en las células transfectadas con el Inh-miR-18b. Las proteínas RO son miembros de una larga familia de proteínas acopladas a proteínas G que son expresados no solo en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio, sino también en otros tejidos no quimiosensitivos y tejidos tumorales como el cáncer de próstata, donde su activación inhibe la proliferación celular. Sin embargo la relevancia y función de los genes RO es aún desconocida en cáncer de mama. De los 55 genes RO encontrados, 10 se encuentran ubicados como clúster en el cromosoma 11q12.1 y 6 en otro clúster en el locus 11q24.2. Para entender como estos genes pueden estar regulados por el miR-18b, buscamos sitios de unión para este miRNA en la región 3'UTR de los genes RO utilizando el software TargetScan v 5.2. De manera importante, ninguno de los RO modulados posee sitios potenciales de unión para el miR-18b. Esto sugiere que los genes RO

podieran estar regulados por un mecanismo indirecto del miR18b. Para probar esta hipótesis, buscamos sitios de unión para el miR-18b en las regiones 3'UTR de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes RO. Entre ellos encontramos la proteína PDX1 que posee sitios potenciales de unión para el miR-18b. En concordancia con esto, los resultados del microarreglo de células MDA-MB-231 transfectadas con el inhibidor del miR-18b muestran la sobreexpresión de este factor de transcripción. Esto sugiere que la sobreexpresión de RO está siendo regulada de forma indirecta por el miR-18b a través de la regulación de PDX1. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis es necesario realizar experimentos adicionales.

Por otra parte, dentro de los datos del microarreglo se encuentran diversos genes modulados implicados en cáncer. Algunos ejemplos son las proteínas de crecimiento tumoral (CHRM2, POSTN), proliferación celular (NLRP7, CHMR2), apoptosis (REG1B, SCN3B, POSTN) y angiogénesis (KLK3, CHRM2, POSTN). Además encontramos ocho genes (KIR3DL3, NLRP7, KLK3, OLFM3, SEMG1, CRX, POSTN, y CEACAM5) que han sido involucrados en la invasión y la metástasis de células tumorales (tabla 16). Las funciones de algunos de estos genes ya han sido claramente establecidas, por ejemplo el gen KLK3 codifica para el antígeno específico prostático (PSA), una proteasa de serina que ha sido establecida como un marcador tumoral de adenocarcinoma prostático. Esta proteína se encuentra elevada en mujeres con carcinoma renal y ha sido demostrado que ejerce propiedades anti-oncogénicas y presenta mutaciones en cáncer de mama. Otro gen sobreexpresado, POSTN,

codifica la periostina, una proteína secretoria que se sugiere participa como una molécula de adhesión en osteoblastos. POSTN también ha sido reportada como sobreexpresada en varios tipos de cáncer con elevada invasividad y correlaciona con la metástasis en cáncer colorectal y de hígado, así como en líneas celulares de cáncer orales.

Para evidenciar la correlación entre la sobreexpresión de estos genes en el microarreglo con la reducción de la expresión del miR-18b, se buscaron sitios de unión a este miRNAs en las regiones 3'UTR de las proteínas. Once de estos genes poseen sitios de unión a este miRNA, nueve de ellos con más de un sitio potencial (tabla 16).

Finalmente, los resultados del microarreglo de células MDA-MB-231 transfectadas con el inhibidor del miR-18b y los antecedentes respecto a las funciones ya conocidas de este miRNA en glioblastoma<sup>167, 217</sup>, sugieren la participación del miR-18b en la migración celular, por lo que decidimos evaluar el efecto de la inhibición del miRNA en dicho proceso.

**Tabla 15. Genes modulados ( $FC \pm 1.5$ ) en células MDA-MB-231 transfectadas con el Inh-miR-18b**

Simbolo	Nombre	Fold change
OR8D2	olfactory receptor, family 8, subfamily D, member 2	7.10
OR8G2	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2; olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3	6.44
OR8D1	olfactory receptor, family 8, subfamily D, member 1	6.36
REXO1L1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like 3 (pseudogene); REX1, RNA exonuclease 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like 2 (pseudogene);	5.94
KRTAP13-1	keratin associated protein 13-1	5.87
ERC2	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2	5.77
OR11H1	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 2; olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 1; olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 13 pseudogene; olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 12	5.65
OR9G1	olfactory receptor, family 9, subfamily G, member 9; olfactory receptor, family 9, subfamily G, member 1	5.63
KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3	5.46
OR52E2	olfactory receptor, family 52, subfamily E, member 2	5.46
NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7	5.33
OR52J3	olfactory receptor, family 52, subfamily J, member 3	5.33
KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	5.33
PRAMEF5	PRAME family member 5	5.32
REG1B	regenerating islet-derived 1 beta	5.26
OR4A47	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 4 pseudogene; olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 47	5.19
OR8H3	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3	5.18
LOC391747	similar to hCG1807616; similar to TBP-associated factor 11; TBP-associated factor 11 pseudogene; similar to TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor; similar to hCG1809904	5.04
OR4A15	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 15	5.00
OR10G8	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 8	4.98
OR2T8	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 8; olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3	4.97
OR4K2	olfactory receptor, family 4, subfamily K, member 2	4.92
KIR2DS2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	4.85
KIR2DS2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	4.83
LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	4.75
OR1C1	olfactory receptor, family 1, subfamily C, member 1	4.71
OR5J2	olfactory receptor, family 5, subfamily J, member 2	4.56
KLK3	kallikrein-related peptidase 3	4.52
PRAMEF4	PRAME family member; PRAME family member 4	4.49
OR1S1	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 1	4.49
CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2	4.47
OR4Q3	olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3	4.44
OLFM3	olfactomedin 3	4.44
OR10H4	olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 4	4.36

## Resultados

WFDC9	WAP four-disulfide core domain 9	4.32
GOLGA6L6	hypothetical LOC645202; Putative golgin subfamily A member 6-like protein 6; hypothetical LOC100132202; golgi autoantigen, golgin subfamily a-like	4.28
PRR20A	FLJ40296 protein family member; proline rich 20	4.28
OR10H3	olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3	4.24
OR5D16	olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 16	4.23
OR8H2	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 2	4.20
C12orf27	chromosome 12 open reading frame 27	4.19
SLA	Src-like-adaptor	4.19
OR6K2	olfactory receptor, family 6, subfamily K, member 2	4.17
OR6N1	olfactory receptor, family 6, subfamily N, member 1	4.15
OR7C2	olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 2	4.12
PCDH15	protocadherin 15	4.12
TRIM49	tripartite motif-containing 53; similar to Tripartite motif protein 49 (RING finger protein 18) (Testis-specific ring-finger protein); similar to ring finger protein 18; similar to hCG1988749; tripartite motif-containing 49; tripartite motif-containing 48; hypothetical protein LOC100131392	3.96
SCN3B	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	3.96
OR10K2	olfactory receptor, family 10, subfamily K, member 2	3.95
OR4C13	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 13	3.95
OR56A4	olfactory receptor, family 56, subfamily A, member 4	3.93
OR2T27	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 7; olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 27	3.89
BTNL8	butyrophilin-like 8	3.88
SEMG1	semenogelin I	3.86
OR52K2	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2	3.84
CRX	cone-rod homeobox	3.82
KLK15	kallikrein-related peptidase 15	3.78
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	3.77
OR1E1	olfactory receptor, family 1, subfamily E, member 1	3.77
DEFB125	defensin, beta 125	3.75
LRFN5	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5	3.72
KLK6	kallikrein-related peptidase 6	3.72
OR2J3	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3	3.69
OR6N2	olfactory receptor, family 6, subfamily N, member 2	3.66
OR8H1	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 1	3.49
IQSEC3	IQ motif and Sec7 domain 3; similar to IQ motif and Sec7 domain-containing protein 3; similar to IQ motif and SEC7 domain-containing protein 3; similar to IQ motif and Sec7 domain 3	3.46
OR8B3	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 3	3.45
KIF2B	keratin associated protein 9-9; keratin associated protein 9-2	3.43
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	3.43
KRTAP9-2	keratin associated protein 9-9; keratin associated protein 9-2	3.42
ZNF705A	zinc finger protein 705 <sup>a</sup>	3.41
FKSG74	ARP3 actin-related protein 3 homolog B pseudogene	3.40
OR4F17	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 17	3.36
OR10Q1	olfactory receptor, family 10, subfamily Q, member 1	3.35
BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1	3.35



## Resultados

C8orf54	chromosome 8 open reading frame 54	3.34
SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1	3.33
KLK2	kallikrein-related peptidase 2	3.32
OR5M8	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 8	3.31
LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14	3.31
OR14I1	olfactory receptor, family 14, subfamily I, member 1	3.31
SLITRK3	SLIT and NTRK-like family, member 3	3.28
Ccdc141	coiled-coil domain containing 141	3.27
COL2A1	collagen, type II, alpha 1	3.24
OR1J4	olfactory receptor, family 1, subfamily J, member 4	3.23
NRA P	nebulin-related anchoring protein	3.19
Klk9	kallikrein-related peptidase 9	3.15
OR5AU1	olfactory receptor, family 5, subfamily AU, member 1	3.11
Taar5	trace amine associated receptor 5	3.09
IL1F8	interleukin 1 family, member 8 (eta)	3.08
LY9	lymphocyte antigen 9	3.08
FLJ34690	hypothetical protein FLJ34690	3.07
GOLGA6L1	hypothetical LOC645202; Putative golgin subfamily A member 6-like protein 6; hypothetical LOC100132202; golgi autoantigen, golgin subfamily a-like	3.07
OR2T29	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 29	3.00
KIR2DS2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	2.99
CSHL1	chorionic somatomammotropin hormone-like 1	2.96
RBM11	RNA binding motif protein 11	2.95
SEMG1	semenogelin I	2.90
CLEC5A	C-type lectin domain family 5, member A	2.90
DSPP	dentin sialophosphoprotein	2.86
KIR2DS4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2; killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	2.83
SLC2A7	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 7	2.80
DCN	Decorin	2.77
OR5AR1	olfactory receptor, family 5, subfamily AR, member 1	2.74
LOC100130256	hypothetical LOC100130256	2.73
GRM7	glutamate receptor, metabotropic 7	2.71
GBA3	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	2.71
MYBPC2	myosin binding protein C, fast type	2.70
OR5M11	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 11	2.69
SSX7	synovial sarcoma, X breakpoint 7	2.69
PPP1R3A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A	2.64
KRTAP10-9	keratin associated protein 10-9	2.64
XAGE5	X antigen family, member 5	2.64
SLC22A8	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	2.63
KLK4	kallikrein-related peptidase 4	2.62
FAM75A2	family with sequence similarity 75, member A2	2.58
FAM90A12	family with sequence similarity 90, member A12	2.57

## Resultados

BHMT2	betaine-homocysteine methyltransferase 2	2.56
NPY6R	neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)	2.53
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2.53
KRTAP19-1	keratin associated protein 19-1	2.52
SLC35D3	solute carrier family 35, member D3	2.52
KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	2.48
GSTA3	glutathione S-transferase alpha 3	2.47
OCA2	oculocutaneous albinism II	2.46
OR8B8	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 8	2.40
PCDHB2	protocadherin beta 2	2.39
RFPL2	ret finger protein-like 2; ret finger protein-like 3	2.39
C6orf15	chromosome 6 open reading frame 15	2.37
KRTAP19-1	keratin associated protein 19-1	2.36
KRTAP6-3	keratin associated protein 6-3	2.33
SPATA22	spermatogenesis associated 22	2.30
DUX4	double homeobox, 4-like; similar to double homeobox 4c; similar to double homeobox, 4; double homeobox, 4	2.29
KRTAP21-2	keratin associated protein 21-2	2.28
ASCL1	achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)	2.26
KCNA6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	2.26
DSC3	desmocollin 3	2.23
KRTAP20-2	keratin associated protein 20-2	2.22
PAX9	paired box 9	2.20
OR4C46	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 46	2.20
GAGE2A	G antigen 2A; G antigen 2B; G antigen 12I; G antigen 12F; G antigen 2E; G antigen 12G.	2.19
GPR32	G protein-coupled receptor 32	2.19
OR6K3	olfactory receptor, family 6, subfamily K, member 3	2.16
C1QTNF4	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	2.16
CCDC36	hypothetical LOC100131840	2.16
DEFB124	defensin, beta 124	2.15
FAM129C	family with sequence similarity 129, member C	2.13
KRTAP6-1	keratin associated protein 6-1	2.13
ADORA3	adenosine A3 receptor	2.11
LOC100129240	hypothetical protein LOC100129240	2.11
CLEC4G	C-type lectin domain family 4, member G	2.10
OR2T5	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5	2.10
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	2.10
OR10S1	olfactory receptor, family 10, subfamily S, member 1	2.09
GAGE8	G antigen 2A; G antigen 2B; G antigen 12I; G antigen 12F; G antigen 2E; G antigen 12G.	2.09
DEFB126	defensin, beta 126	2.08
CSN3	casein kappa	2.07
Kcnk10	potassium channel, subfamily K, member 10	2.04
CXorf59	chromosome X open reading frame 59	2.03

## Resultados

PDE1C	phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	2.02
OR3A2	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 2	2.02
MRGPRX2	MAS-related GPR, member X2	1.99
pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1	1.98
OR2J2	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2	1.98
NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7	1.97
CD300LF	CD300 molecule-like family member f	1.97
KRTAP19-7	keratin associated protein 19-7	1.95
FOXD4L4	forkhead box D4-like 2; forkhead box D4-like 4	1.95
SV2B	synaptic vesicle glycoprotein 2B; hypothetical protein LOC100128403	1.94
SPATS1	spermatogenesis associated, serine-rich 1	1.92
LCE3E	late cornified envelope 3E	1.91
SPIC	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	1.91
Xcr1	chemokine (C motif) receptor 1	1.90
OR2AK2	olfactory receptor, family 2, subfamily AK, member 2	1.88
GAGE7	G antigen 2A; G antigen 2B; G antigen 12I; G antigen 12F; G antigen 2E; G antigen 12G.	1.88
ADORA3	adenosine A3 receptor	1.84
LCE3C	late cornified envelope 3C	1.84
KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	1.83
OR5D14	olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 14	1.82
GLIS1	GLIS family zinc finger 1	1.82
MYOC	myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response	1.81
GAGE1	G antigen 2A; G antigen 2B; G antigen 12I; G antigen 12F; G antigen 2E; G antigen 12G.	1.80
OR1L6	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 6	1.79
IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker).	1.79
GAGE12I	G antigen 2A; G antigen 2B; G antigen 12I; G antigen 12F; G antigen 2E; G antigen 12G.	1.79
CEACAM5	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	1.78
GPR37	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	1.78
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	1.77
CALML5	calmodulin-like 5	1.77
AQP10	aquaporin 10	1.76
MAS1L	MAS1 oncogene-like	1.74
PRKAG3	protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit	1.72
VCX3A	variable charge, X-linked 3A	1.70
LILRA4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4	1.69
FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	1.68
RGS16	regulator of G-protein signaling 16	1.65
CELA3B	chymotrypsin-like elastase family, member 3B	1.63
UGT3A2	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2	1.63
PRSS33	protease, serine, 33	1.63
DEFA1	defensin, alpha 1	1.61
POTEB	POTE ankyrin domain family, member D; POTE ankyrin domain family, member C; POTE ankyrin domain family, member B	1.61

## Resultados

OR13C5	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 5	1.60
KRTAP20-1	keratin associated protein 20-1	1.59
MC4R	melanocortin 4 receptor	1.59
CLEC1B	C-type lectin domain family 1, member B	1.57
FERD3L	Fer3-like (Drosophila)	1.56
Agap2	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2	1.56
WFDC10A	WAP four-disulfide core domain 10A	1.56
MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	1.56
KRT42P	keratin 42 pseudogene	1.55
LILRA6	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6	1.55
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific (phosphodiesterase E1 dunce homolog, Drosophila)	1.55
RSPO1	R-spondin homolog (Xenopus laevis)	1.55
Lst1	leukocyte specific transcript 1	1.54
FAM75D5	FAM75-like protein FLJ46321 pseudogene	1.54
FOXN4	forkhead box N4	1.54
OPRD1	opioid receptor, delta 1	1.53
OR6Y1	olfactory receptor, family 6, subfamily Y, member 1	1.52
MRGPRE	MAS-related GPR, member E	1.52
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	1.50
PELP1	proline, glutamate and leucine rich protein 1	-8.66
FBXW4	F-box and WD repeat domain containing 4	-5.56
LOC400655	hypothetical gene supported by BC013370; BC034583	-4.93
MR1	major histocompatibility complex, class I-related	-4.16
MARCH1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	-4.07
MAK	male germ cell-associated kinase	-4.01
MAGED4B	melanoma antigen family D, 4B; melanoma antigen family D, 4	-3.45
EXOC6	exocyst complex component 6	-3.09
PLEKHH2	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 2	-2.92
FAM113B	family with sequence similarity 113, member B	-2.78
BAIAP2L2	BAI1-associated protein 2-like 2	-2.63
MSTP152	MSTP152	-2.61
THAP9	THAP9	-2.55
KCNK7	potassium channel, subfamily K, member 7	-2.43
C17orf57	chromosome 17 open reading frame 57	-2.32
BEND2	BEN domain containing 2	-2.30
TMEM27	transmembrane protein 27	-2.28
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-2.28
BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	-2.20
TMEM19	transmembrane protein 19	-2.15
ADPGK	ADP-dependent glucokinase	-2.12
SPN	Sialophorin	-2.07
SERPINC1	serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	-2.07
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	-2.05

## Resultados

---

MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	-1.87
FAM113B	family with sequence similarity 113, member B	-1.82
PRO1768	PRO1768	-1.81
RBM6	RNA binding motif protein 6	-1.79
GPR82	G protein-coupled receptor 82	-1.77
SSBP2	single-stranded DNA binding protein 2	-1.71
DUSP21	dual specificity phosphatase 21	-1.69
SRSF12	serine-arginine repressor protein (35 kDa)	-1.69
OGN	Osteoglycin	-1.62
PCDHB9	protocadherin beta 10; protocadherin beta 9	-1.61
TRIM36	tripartite motif-containing 36	-1.60
INPP5B	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 75kDa	-1.60
RORB	RAR-related orphan receptor B	-1.59
ASIP	agouti signaling protein, nonagouti homolog (mouse)	-1.58
TRPM8	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	-1.56
KIAA1211	KIAA1211	-1.53
LOC100128562	hypothetical protein LOC100128562	-1.52
ZNF674	zinc finger family member 674	-1.51
KCNC3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	-1.50

---

**Tabla 16. Genes con función implicada en cáncer modulados por efecto de la inhibición del miR-18b.**

Simbolo	Fold change	Nombre	Descripción	Función en cancer	Referencias
ERC2	5.77	0.044	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2	Promueve la oncogénesis en carcinoma papilar de tiroides por fusión ELKS a RET activando su capacidad tirosina cinasa.	221
KIR3DL3	5.46	0.047	Killer cell immunoglobulin-like receptor	Interacción de KIR3DL3 con MHC-I en células de tumor de melanoma inhibiendo la lisis celular mediada por células NK y linfocitos T.	222, 223
NLRP7	5.33	0.018	NLR family, pyrin domain containing 7	Regula la proliferación celular y la tumorigénesis en células germinales testiculares. Promueve la invasión tumoral en cancer endometrial.	224, 225
KCND2	5.33	0.040	Potassium voltage-gated channel subfamily D2	Participa en el cancer cerebral inducido por el síndrome de desgaste cerebral.	226
REG1B	5.26	0.014	Regenerating islet-derived 1 beta	Regula la producción de IL-6, e incrementa la quimio y radio sensibilidad es células escamosas de cáncer esofágico.	227, 228
KIR2DS2	4.85	0.020	Killer cell immunoglobulin-like receptor	Asociada con la respuesta favorable al tratamiento y la supervivencia prolongada en cancer de células no pequeñas de pulmón. Activa los genes KIR asociados con el riesgo de desarrollar leucemia aguda de células pre-B.	229, 230
KLK3	4.52	0.013	Prostate-specific antigen (PSA). Kallikrein-related peptidase 3	Contribuya a la metástasis y la invasión celular hacia hueso en cáncer de próstata. Los altos niveles de PSA en tumores prostáticos pueden desacelerar la progresión tumoral al inhibir la angiogénesis. Regula la expresión del receptor de andrógenos en cáncer de próstata. Indicador de pronóstico favorable en cancer de mama.	231, 232, 233, 234, 235
PRAMEF4	4.49	0.012	PRAME family member 4	Correlaciona con los marcadores de mal pronóstico en cancer de cabeza y cuello.	236
CHRM2	4.47	0.005	Muscarinic acetylcholine receptor M2	Involucrado en la proliferación de células de adenocarcinoma murino. Involucrado en la proliferación y angiogenesis en las células de cáncer de mama. El receptor de M2 esta involucrado en la inhibición en la proliferación de células de glioma. Involucrado en la proliferación de células de leucemia mielógena crónica.	237, 238, 239, 240, 241

## Resultados

OLFM3	4.44	0.037	Olfactomedin 3/noelin-3	Contribuye a la resistencia a la muerte celular en células escamosas de pulmón. OLFM3 es proangiogenico.	242, 243
PCDH15	4.12	0.014	Protocadherin 15	Marcador potencial de linfomas de células NK y T.	244.
SCN3B	3.96	0.029	Sodium channel subunit beta-3	Media la apoptosis dependiente de p53 en la línea celular de cáncer colorectal HCT116.	245
SEMG1	3.86	0.005	Semenogelin I	Sobreexpresada en la línea celular de pulmón OH-1 SCLC y se asocia con los complejos de adhesión de la superficie celular. Sobreexpresado en células de mielomas. Mutado en cancer colorectal. Sobreexpresión de SEMG1 inhibe el crecimiento de los tumores prostáticos.	246, 247, 248, 249, 250
CRX	3.82	0.012	Cone-rod homeobox protein	Sobreexpresao en meduloblastoma y retinoblastoma. Marcador metastásico de retinoblastoma.	251, 252, 253.
KLK15	3.78	0.003	Kallikrein-related peptidase 15	Sobreexpresado por esteroides en la línea celular prostática LNCaP. Asociada con las formas agresivas de cancer de prostate. Marcador de mal pronóstico en cáncer ovárico. Marcador pronóstico favorable para cancer de mama.	254, 255, 256, 257
POSTN	3.77	0.043	Periostin	Incrementa la invasion, la angiogenesis y la metastasis en cancer oral, de cabeza y cuello. Promueve el crecimiento metastásico del cáncer de colon. Inhibe la progresión en cáncer y la metástasis inhibiendo la periostina en modelos murinos.	258, 259, 260, 261
PCDHB2	2.39	0.019	Protocadherin beta 2	Presenta mutaciones de PCDHB2 en pancreatico cancer.	262
C1QTNF4	2.16	0.010	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	Estimula las vías STAT3 y NF-kB promoviendo la sobrevivencia celular en distintos tumores humanos.	263
FOXD4L4	1.95	0.010	Forkhead box D4-like 4	Se encuentra hipermetilado en tumors de ovario así como en el cáncer pulmonar de células no pequeñas	264, 265, 266, 267, 268, 269
CEACAM5	1.78	0.034	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	Su expression se asocia a mal pronóstico en adenocarcinomas. Se asocia a la metástasis cerebral.	
MAGED4B	-3.45	0.043	Melanoma-associated antigen 4B	Su sobreexpresión incrementa la migración celular y el crecimiento en células escamosas de cancer oral y es asociada con un mal pronóstico de la enfermedad.	270

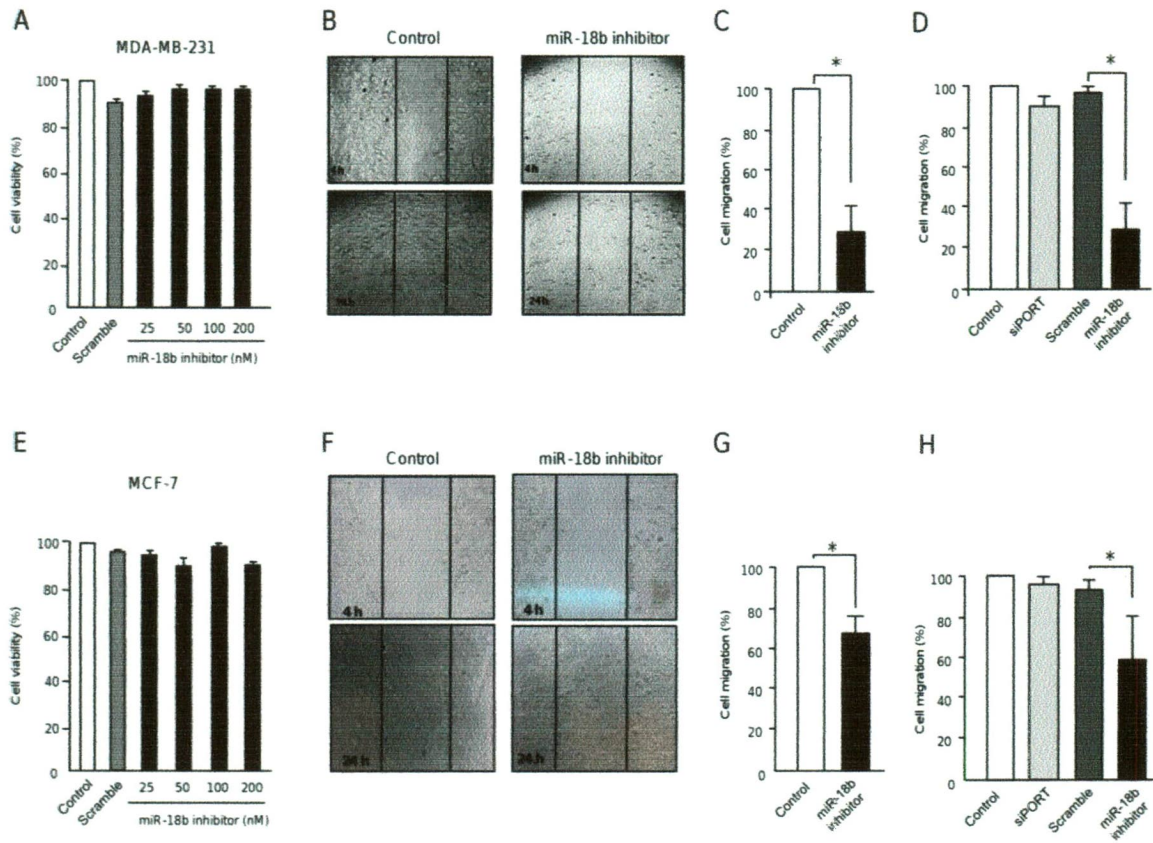
### 19. El miR-18b inhibe la migración celular *in vitro*.

Considerando que el miR-18b modifica los niveles de expresión de genes asociados a la migración celular como KLK15, PCDHB2, POSTN, MAGED4B, KLK3 entre otros (tabla 16), evaluamos el efecto de la represión del miR-18b en la migración celular a través del ensayo de Wound-healing. Para ello células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron transfectadas con 50 nM del inhibidor miR-18b acorde a lo descrito en metodología. Los resultados muestran que las células control (sin transfectar) restablecieron el espacio vacío en la monocapa (el número de células migrantes fue considerado como el 100%) y que dicha migración fue reducida por el efecto de la transfección en un 60% en células MDA-MB-231 y en un 30% en células MCF-7 (Fig. 20).

Estos datos fueron corroborados mediante el ensayo de migración en cámaras transwell. Los resultados muestran la misma tendencia de los ensayos anteriores en ambas líneas celulares (Fig. 20 D, H). registrando una reducción en la migración del 70% en las células MDA-MB-231 y del 40% en las células MCF-7, en comparación con sus respectivos controles. Las células tratadas con el agente transfectante y con el scramble no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Estos datos nos permiten concluir que la inhibición del miR-18b modula la migración celular en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.



Los resultados El análisis de los genes reprimidos y expresados por la inhibición del miR18b nos lleva a concluir que los efectos en la reducción de la migración e invasión es a través de un mecanismo que puede implicar a los genes con funciones conocidas en dicho evento. Quedan aún estudios por desarrollar que permitan explicar cuál es el mecanismo exacto que modula la migración, así como cuál es la importancia y participación de los genes Ros en el contexto del cáncer de mama, por lo que una perspectiva de este trabajo es desarrollar a futuro investigaciones que den respuesta a estas cuestiones.



**Figura 25. El miR-18b modula la migración celular.** Paneles superiores células MDA-MB-231 A) Viabilidad celular B) Ensayo de migración C) Representación grafica de B. D) Migración en cámaras transwell. Paneles inferiores células MCF-7, E) Viabilidad celular D) Ensayo de migración G) Representación grafica de F. H) Migración en cámaras transwell.

## VII. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia que ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad entre las mujeres en el mundo. Aunque es una enfermedad ampliamente estudiada, hasta el momento los métodos y estrategias de detección temprana son insuficientes, por lo que, aunado a un incremento en la incidencia de la enfermedad, hacen que el cáncer de mama se haya convertido en un problema de salud pública. Así mismo, los tratamientos que existen contra este tipo de cáncer son pocos en comparación con la amplia heterogeneidad molecular de la enfermedad. Por ello el entendimiento biológico del cáncer de mamá es fundamental para el desarrollo de nuevos métodos de detección y terapias de tratamiento.

Algunas moléculas biológicas como proteínas y DNA, han sido analizadas en la búsqueda de marcadores moleculares que puedan ser utilizados en la detección y terapia del cáncer de mama. En la última década, otras moléculas como los miRNAs han tomado gran importancia en el contexto biológico del cáncer, pues de manera general, se ha descrito su participación y función en los procesos oncológicos, por lo que son excelentes candidatos para ser utilizados como marcadores moleculares. Por ello el ánimo de este trabajo fue determinar los perfiles de expresión de miRNAs en tumores de mama de pacientes mexicanas.

El análisis de miRNAs mediante TLDA nos permitió obtener un perfil de expresión de miRNAs en tumores de mama de mujeres mexicanas. Hasta el momento el único reporte de la expresión de miRNAs en pacientes mexicanas corresponde al trabajo realizado por Romero-Córdoba *et al.* La importancia de realizar este tipo de estudios en la población endémica de nuestro país radica en que pueden existir variables a nivel poblacional en la expresión de miRNAs y que estas variables podrían asociarse al desarrollo del cáncer de mama. Esto podría explicar, al menos en parte, las diferencias en la incidencia del cáncer de mama en países como Japón, donde las mujeres no alcanzan los niveles de mortalidad e incidencia que se presenta en los países más desarrollados de Europa. Aunque estas diferencias pueden explicarse por otras razones que van desde los hábitos alimenticios hasta la variabilidad génica, es probable que estén involucradas moléculas como los miRNAs por lo que futuros análisis comparativos de la expresión de miRNAs en pacientes mexicanas y otro tipo de poblaciones brindaran estas respuestas.

Los resultados obtenidos del análisis  $\Delta\Delta CT$  de las placas TLDA mostraron la modulación de 54 miRNAs con un  $FC=\pm 2$  y un valor de  $P=0.05$ . De estos, 30 se encontraron reprimidos y 24 sobreexpresados. Al revisar los datos bibliográficos encontramos que 40 de estos miRNAs ya han sido reportados en algún tipo de cáncer incluyendo el de mama. Estos miRNAs pueden ser importantes en estudios que puedan realizarse posteriores a este, un análisis prospectivo de estas mismas pacientes podría brindarnos información relevante

sobre la dinámica de la expresión de miRNAs o bien la sobrevida de los pacientes después de la remoción del tumor.

Un ejemplo es el caso del miR-21, que encontramos sobreexpresado en las muestras analizadas. Diversos estudios demuestran que la sobreexpresión de este miR-21, correlaciona con un mayor estadio tumoral y que se asocia a una baja sobrevida de las pacientes después de la resección del tumor, las cuales presentan un mayor índice metastásico hacia los nódulos linfáticos y promueve el crecimiento celular mediante la inhibición de los genes supresores de tumor tropomiosina-1 (TPM1) y de muerte celular programada 4 (PDCD4). Estudios posteriores a este podrían evaluar la sobrevida de las pacientes mexicanas que mostraron una sobreexpresión de este miR.

Otro ejemplo corresponde al caso del miR-10b, el cual se encontró como suprimido en los tumores mamarios analizados. En otros estudios se ha demostrado que la expresión del miR-10b es requerida para la invasión y la metástasis en el cáncer de mama, pero no para su viabilidad. Además, estudios *in vivo* indican que células con sobreexpresión de este miRNA presentan una elevada angiogénesis, favoreciendo la invasión y la metástasis al reducir el RNAm del factor de transcripción HOXD10, un supresor de tumor que es blanco del miR-10b.<sup>117</sup> En adición a esto, los tumores donde este miRNA se expresa adquieren capacidades metastásicas. Lo anterior es consistente con nuestros datos ya que ninguna de las pacientes analizadas por TLDA presenta metástasis, por lo que es de esperar la expresión disminuida de este miRNA.

Un estudio posterior que realice el seguimiento de las pacientes analizadas, nos permitirá definir si en los casos de recaída este miRNA incrementa su expresión.

Por otra parte, existen algunos miRNAs que han sido reportados en otros tipos de cáncer pero no en el de mama. Ejemplo de esto es miR-301a, el cual ha sido reportado previamente en cáncer pancreático como un regulador de NF-KB favoreciendo la metástasis, o el miR-337-3p, encontrado en cáncer de células no pequeñas de pulmón, actuando como un modulador positivo al paclitaxel, sensibilizando las células a este quimioterapia. Aunque es factible extrapolar las funciones de un miRNA, se requieren estudios adicionales para corroborar las implicaciones de estos miRNAs en los carcinomas mamarios.

Los resultados del perfil de expresión también muestran miRNAs que no han sido descritos en ningún tipo de cáncer, por lo que este estudio suma estos miRNAs a los previamente ya descritos. Es aquí donde cabe destacar la importancia de los programas de predicción de blancos de miRNAs, ya que estos nos permiten elucidar los genes que se estén regulando. La base de datos TargetScan nos permitió obtener una lista de mensajeros objetivo para cada uno de estos miRNAs. Es posible encontrar mensajeros de proteínas relevantes en cáncer, por ejemplo dentro de los blancos potenciales del miR-656 esta SMAD2, JunB, MPK3, entre otras, que sin duda alguna hacen que este miRNA sea interesante como objeto de estudio. Sin embargo es importante

analizar la totalidad de los resultados y considerar que existen miRNAs que pueden regular un número importante de genes implicados en una sola vía o proceso. Desde el punto de vista biológico, un miRNA que funcione de esta manera y que regule procesos oncogénicos canónicos tiene el potencial de ser un blanco con un gran valor terapéutico.

Por otra parte, estas mismas herramientas bioinformáticas nos permiten elaborar un mapa de las diversas alteraciones que poseen las células cancerígenas. Existe un número importante de blancos para cada uno de los 54 miRNA modulados en cáncer de mama, sin embargo una lectura fundamental, es determinar que procesos celulares o vías de señalización se regulan por el conjunto de miRNAs alterados. El análisis de enriquecimiento, nos permitió señalar que un gran número de blancos predichos se agrupan en la vía de señalización de MAPK, la adhesión focal, las vías WNT, TGF- $\beta$ , ErBb y genes que han sido descritos en padecimientos como cáncer colorectal y de próstata. Esto sugiere que los mecanismos de regulación sobre estas vías y procesos, implica a varios miembros de los miRNAs modulados en cáncer de mama y dichas alteraciones en la expresión de miRNAs no son azarosas, sino que están dirigidas o seleccionadas para regular a las vías mencionadas. Es notable que estas vías de señalización o sus elementos participen en diversos procesos como la división celular, apoptosis, migración e invasión, mientras que no se encontró enriquecimiento en procesos asociados al metabolismo de glucosa o lípidos, procesos que también son alterados en cáncer.

Estas observaciones se refuerzan al esquematizar la posible regulación coordinada de varios miRNAs sobre una misma vía de señalización. Por ejemplo, la figura 2, señala como un grupo de miRNAs convergen en blancos potenciales de la ruta MAPK, donde un mismo miRNA regula más de un elemento de la vía y que a su vez, otros miRNAs actúan de manera similar sobre los mismos blancos u otros blancos, lo cual sugiere un mecanismo fino de regulación de la expresión mediada por los miRNAs, a través de la expresión coordinada de estos.

Un dato relevante de nuestro trabajo es la identificación de la represión coordinada de un grupo de 9 miRNAs localizados en el clúster 14q32. Este locus tiene una gran importancia clínica. Más de 40 miRNAs son presentes en esta región, localizada entre los genes improntados DLK1 y DIO3. El clúster 14q32 ha sido encontrado deletado en otro tipo de tumores como el osteosarcoma en donde la baja expresión de los miRNAs de este locus ha sido correlacionada con el desarrollo de metástasis. La delección de este clúster y su relación en la metástasis se apoya en el hecho de que los transcritos de genes involucrados en dicho proceso son significativamente enriquecidos como CDK5 y TWIST1 en tumores con bajos niveles de miRNAs del locus 14q32. En contraste, otros genes como IFNB1, TEK y COL18A1 son genes que reprimen la metástasis y su expresión es disminuida en pacientes con bajos niveles de los miRNAs 14q32. Otro ejemplo es TK1, un gen que correlaciona inversamente



con los genes de este locus. Su importancia radica en que este gen está altamente expresado en células sumamente proliferativas correlacionando con un alto riesgo en múltiples cánceres. Estos datos sugieren que los genes y los miRNAs de este clúster pueden ser blanco potencial de tratamiento en pacientes metastásicos o ser utilizados como marcadores de pronóstico. Sin embargo, en contraste de lo que ocurre en el osteosarcoma, en el cáncer de mama este locus no es deletado, por lo que es posible suponer que la represión de los miRNAs de este locus debe ser regulada mediante un mecanismo como la modulación en la expresión génica por cambios asociados a la epigenética tumoral<sup>144, 150, 298</sup>. Para corroborar esta teoría es necesario realizar otro tipo de experimentos que nos ayuden a corroborar esta teoría.

Muchos de los miRNAs aquí reportados merecen ser objetos de estudio funcionales. A este respecto un par de miRNAs llamaron fuertemente nuestra atención. Al considerar todos los blancos predichos y realizando un análisis de enriquecimiento, notamos que los miR-944 (reprimido) y miR-18b (sobreexpresado) pueden modular vías de señalización tradicionalmente asociadas desarrollo del cáncer (TGF- $\beta$ , mTOR, uniones adherentes, cáncer colorectal). Además de esto, notamos que los valores de expresión relativa de estos miRNAs eran similares entre las distintas muestras analizadas, lo cual sugiere una implicación directa y constante en el proceso cancerígeno y no una alteración secundaria o pasajera. Finalmente, considerando estos criterios, estos miRNAs fueron seleccionados para su estudio funcional. En el caso del

miR-944, este no había sido descrito antes en algún tipo de cáncer, lo que lo convierte en un nuevo y potencial blanco de terapia, y está localizado dentro de la región 3q28 en un intrón del oncogén p63, lo que sugiere una regulación coordinada entre esta proteína y su miRNA.

En contraste el miR-18b ya ha sido más estudiado. Se localizó en el cromosoma X dentro del clúster miR-106a-363 constituido por 6 miRNAs. Diversos reportes asocian la expresión aberrante del miR-18b a diversas patologías humanas incluyendo hipertrofia cardíaca, esclerosis múltiple e infección crónica del virus de la hepatitis B. El miR-18b es sobreexpresado en cáncer gástrico y tumores benignos de ovario. Algunos genes como NOTCH2, NEDD9 and MEKK1 han sido identificados como blancos del miRNA-18b. En cáncer de mama miR-18b regula negativamente la señal del receptor de estrógenos $\alpha$ . En otros estudios, la baja expresión del miR-18b fue asociada con una baja supervivencia en tumores Her2 negativos, aunque esto no correlaciona con los niveles del receptor de estrógenos  $\alpha$ . Recientemente, los altos niveles del miR-18b circulante, fueron propuestos como un potencial marcador de cáncer de mama. Aunque el conocimiento sobre el miR-18b ha ido aumentando, las funciones fisiológicas del miR-18b aun no han sido claramente establecidas y el número de blancos de este miRNA es escaso. Los datos previamente reportados junto con la expresión encontrada en este estudio, hacen del miR-18b un claro objeto de estudio.

Por ello, el primer paso para evaluar funcionalmente a estos miRNAs, fue validar su expresión, tanto en un set más amplio de muestras tumorales (agrupadas por su clasificación con base a receptores) como en diversas líneas celulares de mama. Como puede apreciarse en los resultados, el miR-944 mostró una represión constante en todos los tejidos tumorales analizados respecto al tejido mamario normal. Esto indica una participación importante dentro del proceso tumoral. Además la falta de correlación con alguna característica histopatológica sugiere que los mecanismos que modula o participa este miRNA debe ser ubicuo en el contexto celular y no depender de alguna característica como es estatus de receptores o el grado tumoral. De manera sorprendente, la expresión del miR-944 también se encontró reprimida en todas las líneas celulares mamarias analizadas. De igual manera no existe correlación alguna con el estatus hormonal de las células. Una incógnita que surge es, si la expresión de este miRNA es categórica para los tejidos mamarios, o si existen variaciones importantes con respecto a otros tipos tumorales.

En el caso del miR-18b, su expresión fue alta en todos los tejidos tumorales respecto al normal, destacando el aumento considerable en las muestras triple negativo. Esto sugiere la posibilidad de que exista una correlación entre el estatus hormonal y la expresión de este miRNA, sin embargo es necesario aumentar el número de tumores analizados para corroborar esto. La idea de la asociación del estatus hormonal y la expresión

del miR-18b es reforzada con los resultados de expresión de este miRNA en líneas celulares, donde fue posible apreciar que la línea MDA-MB-231 es la que posee una expresión más alta de este miRNA, dicho cultivo es considerado un triple negativo.

Una vez que se validó la transfección de las moléculas precursoras del miR-944 e inhibidoras del miR-18b, se analizó el efecto de estas transfecciones en la viabilidad celular. Los resultados demostraron que ninguno de estos miRNAs tiene efecto sobre la viabilidad celular aún en dosis altas del precursor/inhibidor (datos no mostrados). Esto sugiere que estos miRNAs no participan en procesos como la apoptosis o división celular. Para determinar cuáles pueden ser las funciones en las que participan estos miRNAs, analizamos el transcriptoma de las líneas celulares transfectadas. Los datos muestran que al insertar una molécula supresora de la transcripción como el miR-944, de los 1342 genes modulados 1197 genes son reprimidos con una tasa de valor inferior a -2.0, aunque este resultado es esperado para un represor traduccional. Posteriormente al contrastar los 531 blancos predichos por la base de datos TargetScan contra los genes modulados en el microarreglo, encontramos 66 genes como posibles blancos directos de miR-944. Entre estos genes cabe destacar la presencia de genes que modulan la migración e invasión. Estos datos sugieren que la mayor parte de los genes que se modularon por presencia del miR-944 son blancos indirectos de este miRNA. Por ende, al considerar los resultados del transcriptoma y someterlos a un

análisis de enriquecimiento es posible correlacionar el papel del miR-944 en procesos el metabolismo celular, genes en cáncer, regulación del citoesqueleto de actina y adhesión focal, como procesos regulados por el miR-944 de forma indirecta. En el caso de los 66 blancos directos del miR-944, encontramos que 36 de ellos pueden estar asociados en procesos de migración entre ellos Existe un grupo de genes que participan en los procesos de migración, invasión y metástasis como PRKCA, BRIP1, PAK1 y MTDH entre otros por lo que considerando los blancos directos y predichos para el miR-944 que fueron encontrados en el microarreglo de expresión se analizo la invasión y la migración en las células mamarias.

En el caso del miR-18b, a través de los microarreglos realizados en células transfectadas con el inhibidor, encontramos la regulación de 263 genes (43 genes reprimidos y 220 sobreexpresados) algo que es presumible considerando que se inhibe la expresión de un regulador negativo de la expresión génica, por lo tanto un número mayor de genes deben incrementar su expresión. Al considerar los genes modulados por este miRNA y realizar un análisis de enriquecimiento con el programa DAVID, encontramos las proteínas RO que elevan de manera importante su expresión. Las proteínas RO son miembros de una larga familia de proteínas acopladas a proteínas G que son expresados no solo en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio, sino también en otros tejidos no quimiosensitivos y tejidos tumorales como el cáncer de próstata, donde su activación inhibe la proliferación celular. Sin embargo la

relevancia y función de los genes RO es aún desconocida en cáncer de mama. De los 55 genes RO encontrados, 10 se encuentran como clúster en el cromosoma 11q12.1 y 6 fueron agrupados en el clúster 11q24.2 locus. Para entender como los genes de estos genes pueden estar regulados por el miR-18b, buscamos sitios de unión para el miR-18b en la región 3'UTR de los genes RO utilizando el software TargetScan v 5.2. De manera importante, ninguno de los RO modulados posee sitios potenciales de unión para el miR-18b. Esto siempre la posibilidad que los genes RO pudieran estar regulados por un mecanismo indirecto del miR18b. Para probar esta hipótesis, buscamos sitios de unión para el miR-18b en las regiones 3'UTR de los factores de transcripción que se sabe regulan la expresión de los genes RO. De manera interesante, encontramos el factor de PDX1, el cual actúa como un factor de transcripción para las proteínas RO, tiene sitios potenciales de unión para el miR-18b. El gen de PDX1 se encontró sobreexpresado en los genes que encontramos en nuestro microarreglo. Estos datos sugieren que la expresión de RO está siendo regulada por un mecanismo indirecto que depende de la activación de los factores de transcripción que regulan su expresión. Para comprobar estas hipótesis es necesario realizar experimentos adicionales.

Por otra parte los datos del microarreglo de células MDA-MB-231 transfectadas con el Inh-miR-18b, nos permitieron identificar diversos genes involucrados en cáncer. En la tabla 16 se muestra un resumen de ellos, los cuales han sido implicados en diversos procesos oncológicos. Por ejemplo

crecimiento tumoral (CHRM2 y POSTN), proliferación celular (NLRP7 and CHMR2), apoptosis (REG1B, SCN3B, POSTN), y angiogénesis (KLK3, CHRM2, and POSTN). Además encontramos ocho genes (KIR3DL3, NLRP7, KLK3, OLFM3, SEMG1, CRX, POSTN, y CEACAM5) que han sido involucrados en la invasión y la metástasis de células tumorales. El gen KLK3 gene codifica para el antígeno específico prostático (PSA), una proteasa de serina que ha sido establecida como un marcador tumoral de adenocarcinoma prostático. Esta proteína se encuentra elevada en mujeres con carcinoma renal y ha sido demostrado que ejerce propiedades anti-oncogénicas y presenta mutaciones en cáncer de mama. Otro gen sobreexpresado, POSTN, codifica la periostina, una proteína secretoria que se sugiere participa como una molécula de adhesión en osteoblastos. POSTN también ha sido reportada como sobreexpresada en varios tipos de cáncer con elevada invasividad y correlaciona con la metástasis en cáncer colorectal y de hígado, así como en líneas celulares de cáncer orales. Para determinar si la sobreexpresión de estos genes en nuestro microarreglo es relacionada con la reducción de la expresión del miR-18b, se buscaron sitios de unión al miR-18b en sus regiones 3'UTR. Once de estos genes poseen sitios de unión a este miRNA, nueve de ellos con más de un sitio potencial. Entre estos genes se encuentran KIR3DL3, KLK3, CRX y POSTN) que han sido implicados en la invasión y metástasis de células cancerígenas.

Como puede apreciarse tanto el miR-944 y el miR-18b parecen tener implicaciones en los procesos de migración, por lo que los experimentos

funcionales fueron dirigidos a evaluar dicha propiedad. Para evaluar el efecto de la expresión del miR-944 en la migración celular se realizó el ensayo Wound-healing. Este ensayo consiste en evaluar la restauración de la monocapa cuando esta es parcialmente destruida mediante un trazo fino, si existe un efecto del miRNA analizado en la migración celular las células transfectadas presentaran una disminución en la migración respecto al control. Dado el potencial papel del miR-944 y del miR-18b en la regulación de la migración e invasión celular debido a sus blancos predichos es consecuente analizar el efecto del miR-944 en la migración celular. Como pudo apreciarse en los resultados, en ambos casos la migración es reducida por efecto de la expresión/inhibición del mir-944/miR-18b respectivamente. Los primeros experimentos realizados con ensayos Wound-healing mostraron una disminución promedio en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 del 80-90% con el pre-miR-944 y del 40-70% con el Inh-miR-18b. Estos resultados muestran que estos miRNAs están implicados en la migración celular y que este efecto no fue dosis dependiente. Así mismo, estos ensayos pueden verse afectados por el mismo crecimiento celular, por lo cual fue necesario evaluar este mismo efecto a través de otra metodología como las cámaras transwell. La diferencia entre este ensayo y el primero es que la migración va a estar determinada por el número de células que logren migrar al espacio inferior de la cámara, mientras que en el primero, la cicatrización de la herida puede deberse a un efecto del crecimiento celular más que un proceso migratorio. Con base en los resultados obtenidos con esta metodología, comprobamos los resultados



anteriores, encontrando una disminución del 40-70% con el inhibidor del miR-18b y del 70-85% con el pre-miR-944. Estos resultados muestran de manera contundente la participación de estos miRNAs en la migración celular.

Así mismo, se consideró la posibilidad de evaluar el proceso de invasión celular, el cual a diferencia de la migración es favorecido en células invasivas y metastásicas gracias a la secreción continua de proteasas. Al realizar el análisis de invasión en cámaras transwell con matrigel, los resultados indicaron que el miR-944 está involucrado en los procesos de invasión celular. Estos resultados hacen que los miRNAs que analizamos funcionalmente adquieran relevancia y la potencialidad de convertirse en blancos, ya que se determinó que su presencia u ausencia no es relevante para la viabilidad celular pero si para la migración en células tumorales, por lo cual pueden ser blanco de estudio para el desarrollo de una terapia de apoyo evitando la propagación del tumor en pacientes que padecen esta enfermedad.

Por otra parte, nuestro esfuerzo por comprender el mecanismo en el cual el miR-944 modula la migración y la invasión celular en células MDA-MB-231 nos llevó a reanalizar nuestros datos con mayor interés. De manera interesante, el análisis de enriquecimiento y ontología de los datos del microarreglo en células transfectadas, muestra algunos procesos biológicos regulados por miR-944 incluyendo la regulación de la longitud de los filamentos de actina y su polimerización o despolimerización, así como la regulación del citoesqueleto de actina entre otros. Estos procesos biológicos están asociados con la motilidad

celular, la formación de filopodios, lamelipodios y adhesión focal (Vías hsa04510 : KEGG). Según nuestros datos experimentales, la reducción de la migración y la invasión de miR - 944, mediada por la adhesión focal (AF); un importante proceso biológico implicado en este tipo de eventos celulares, es un potencial proceso biológico afectado por este miRNA . Con el fin de probar esta hipótesis se evaluaron los cambios en la expresión de los principales componentes de las proteína de AF por Western blot y posteriormente a través de ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados mostraron de manera contundente la estabilización de los complejos de AF que en consecuencia tienen un importante efecto en la disminución de la migración y la invasión celular en células MDA-MB-231. La AF son complejos de proteínas presentadas en la superficie basal de las células, que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto y son estructuras muy dinámicas (ensamblaje/desmontaje) con diversas implicaciones sobre la motilidad celular, la migración y la invasión de las células cancerosas <sup>271</sup>. Estos complejos están formados por más de 50 proteínas identificadas hasta el 2001. Entre estas proteínas las integrinas y las proteínas adaptadoras tales como talina,  $\alpha$ -actinina, filamina, vinculina, paxilina y proteínas de señalización intracelular , tales como la cinasa de adhesión focal ( FAK ), son componente básicos de este complejo <sup>272</sup> . En nuestros análisis evidenciamos la modulación de la expresión de estas proteínas, la transfección del pre-miR-944 aumenta considerablemente la expresión de las proteínas integrina B1, Actinina, Talina , P-Paxilina y P-FAK, y reduce las proteínas JNK en contraste con la expresión de las células control. Sólo proteína Vinculina no

muestran ningún cambio en las células transfectadas. Los cambios en estas proteínas que forman parte del complejo AF sugieren que la expresión forzada del miR-944 en una línea celular metastásica de cáncer de mama como MDA-MB- 231, reduce la migración y la invasión a través del incremento en la expresión de los componentes de la AF .

Esto sugiere que el miR-944 se transcribe de manera conjunta con la proteína p63, la cual a su vez tiene dos isoformas por dos promotores alternativos. La isoforma  $\Delta$ Np63 está relacionada con el desarrollo de la piel <sup>299</sup>, mientras TAp63 se asocia a funciones apoptóticas <sup>300</sup>. En el tejido prostático tumoral, la expresión de p63 se pierde, mientras que en el tejido prostático normal se conserva <sup>301</sup>.

El aumento en estas proteínas nos llevó a suponer que la reducción en la migración celular es a través de la estabilización de las estructuras de la AF. Esto está apoyado por otros reportes, por ejemplo Liante M, 2005 <sup>273</sup>, muestra que en las células MDA-MB-231, la sobreactivación de Rho conduce a la inhibición de la migración celular a través de la formación de la AF altamente estable, acompañada de estabilización de las fibras de actina y vinculina. En efecto, la proteína de andamiaje talina es un componente y regulador importante de la AF, más aún, la talina activa las integrinas e inicia la formación de la AF <sup>274, 275, 276</sup>, mientras que la degradación de Talina por calpaína conduce al desmontaje de la AF y en consiguiente promueve la migración <sup>277</sup>, en

contraste, la inhibición de calpaina estabiliza específicamente las adhesiones focales periféricas, aumenta la adhesividad y disminuye la tasa de desprendimiento de las células <sup>278</sup>, destacando la importancia y la contribución de la estabilización de la AF en la inhibición de la migración. Otros estudios muestran que la cinasa de fosfato fosfatidilinositol tipo I  $\chi$  ( PIPKI  $\chi$  ) media la formación de complejos de AF en las células de cáncer de colon a través de la producción de PI(4,5)P2 que promueve la unión de la vinculina y talina a la actina del complejo , mientras que los mutantes de quinasa de PIPKI  $\chi$ K188 y 200R o la represión de PIPKI  $\chi$  no lograron promover la formación de AF, con lo cual se inhibe drásticamente la capacidad invasora de la línea celular de cáncer de colon HCT116 <sup>279</sup>. Otros experimentos muestran de la Filamina A suprime la invasión de células de cáncer de mama mediante la inhibición del desmontaje de la AF. En el estudio de Xu Yu, *et al.*, 2010 <sup>280</sup>, él encuentra mediante análisis de arreglos de tejido mamario de pacientes con CaMa, una correlación entre los bajos niveles de Filamina A y la progresión del CaMa y encuentra una correlación inversa con el aumento de esta proteína y la reducción de la migración y la invasión a través de ensayos en líneas celulares de cáncer de mama, así como en modelos de ratón xenógrafos de cáncer de mama en el que la disminución de Filamina A, favorece la invasión de células de cáncer y la formación de metástasis . Aunado a esto, otros estudios demuestran la importancia de la estabilidad de la AF en la migración. Por ejemplo, el EGF induce el desmontaje de la AF en los fibroblastos, en consecuencia una disminución en la fuerza de adherencia y por lo tanto un aumento en la

migración celular <sup>281</sup>. La proteína DRR de carcinomas de células renales, promueve la invasión en glioma a través del desmontaje de la AF <sup>282</sup>. FAK también promueve el desmontaje de la AF, la invasión de células cancerígenas y se considera una molécula central que participa en la motilidad celular por la señalización mediada a través de integrinas. La activación por fosforilación de esta proteína es marcador desmontaje de la AF, aunque no es la única implicación, la activación de FAK es la protección contra la apoptosis <sup>283</sup>. Por ejemplo, asociación de las integrinas  $\alpha 5, \beta 1$ , o  $5\alpha, \beta 3$  a las proteínas PI3K o FAK, llevan a la supervivencia de células CHO en condiciones libres de suero, mientras que la expresión de FAK constitutivamente activada es suficiente para las células sobrevivan independiente del anclaje <sup>284</sup>. Además, varias proteínas de señalización, incluyendo cinasas y fosfatasas, también son reclutadas a la AF, desde ahí transmiten señales a la matriz extracelular provenientes de las vías de señalización que controlan la proliferación, la supervivencia y la migración <sup>285</sup>. Esto demuestra que FAK tiene un papel primordial en la supervivencia además de su función en la regulación de la AF. La activación de FAK en las células transfectadas con miR-944 puede ser una señalización de supervivencia independiente a su función en la AF; experimentos adicionales podrán soportar esta observación. En este contexto, Takino, et.al, 2006 <sup>286</sup>, muestra que la inhibición endógena de MT1-MMP por BB94 (un inhibidor sintético de MMP) dio lugar a la supresión de la migración celular. El tratamiento con BB94 promueve la formación estable de la AF incluyendo un aumento en la fosforilación de la tirosina 397 de FAK y la reducción de la activación de ERK

.Este resultado es similares se al encontrado en nuestros estudios, incluyendo la activación de FAK y la estabilización del complejo de AF.

De forma interesante, estudios anteriores muestran que la activación de FAK induce las vía de señalización invasivas que implican a RAC1 y Jun N-cinasa terminal (JNK) que a su vez promueven la síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la invasión celular <sup>287, 288</sup>. Nosotros encontramos que la expresión de miR -944 reduce la expresión de JNK, independiente de la activación de FAK. Esto sugiere que la reducción en la invasión por este miRNA no sólo se debe la estabilización de AF, también puede explicarse por la reducción en la JNK y en consecuencia, una reducción en la secreción de las MMP. Esto es apoyado por otros estudios que demostraron que la inhibición de JNK por compuestos como el ácido gálico <sup>289</sup>, y moléculas de shRNA y siRNA <sup>290, 291</sup> disminuyen la migración y la invasión en las células de humano y de ratón. Curiosamente, MT1-MMP (MMP14) una proteína importante rio abajo de señalización de JNK y elemento fundamental en la degradación de MEC en la invasión celular es reprimida en presencia de miR -944 (ver resultados del arreglo), lo cual refuerza esta teoría.

En resumen, el aumento de la expresión de la integrina, Talin, Paxillin y la reducción de JNK indican que la AF es proceso biológico que puede ser regulado de manera indirecta por el miR -944. La estabilización de los complejos de AF evidenciada mediante inmunofluorescencia, muestra que este

es el mecanismo por el cual el miR-944 reduce la migración celular y la invasión en células MDA-MB-231 transfectadas con el precursor. La estabilización de los complejos AF impide su rotación y desmontaje, procesos mecánicos necesarios para la motilidad celular. Finalmente, será necesario realizar experimentos adicionales que permitan encontrar cuales son las proteínas blancos del miR-944 que modulan las proteínas de la AF y encontrar el mecanismo molecular que llevan al efecto final de la reducción en la migración e invasión celular.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron 54 miRNAs ( $FC \pm 2.0$   $P= 0.05$ ) modulados diferencialmente entre el tejido mamario normal y tumoral. 34 de ellos reprimidos y 20 sobreexpresados.
- 2) Los 54 miRNAs modulados en los tumores pueden regular procesos y vías de señalización involucradas en cáncer
- 3) Se encontró reprimida la expresión de 9 miRNAs del clúster 14q32 en los tumores analizados.
- 4) La expresión del miR-944 se encontró reprimida en las líneas celulares y en los tumores de mama respecto al tejido mamario normal.
- 5) La transfección del miR944 no afecta la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231
- 6) La expresión ectópica del miR-944 modula la expresión de 1342 genes (1197 genes reprimidos, 144 genes sobreexpresados) entre ellos genes que participan en la regulación de la migración e invasión celular.
- 7) El miR-944 suprime la migración y la invasión celular in vitro.
- 8) El miR-18b se encontró sobreexpresado en las líneas celulares y tumores mamaros respecto al tejido mamario normal.



- 9) La transfección del miR-18b no afecta la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231
- 10) La expresión ectópica del miR-18b modula la expresión de 263 genes (43 genes reprimidos, 220 genes sobreexpresados) entre ellos genes que participan en la regulación de la migración e invasión celular.
- 11) El mir-18b puede estar regulando a las proteínas ORF de forma indirecta mediante la expresión de la proteína PDX1.
- 12) El miR-18b suprime la migración celular.

## VIII. ANEXOS

## ANEXO A. Soluciones y reactivos

## Preparación de geles de poliacrilamida (sds-page)

Para 4 mini geles:

Soluciones	Gel Separador		
	7.5%	10%	12%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	11.25 ml	15 ml	18 ml
1.5 M Tris pH 8.8	11.25 ml	11.25 ml	11.25 ml
dH <sub>2</sub> O	21.7 ml	18 ml	15 ml
SDS 10%	0.45 ml	0.45 ml	0.45 ml
APS 10%	0.35 ml	0.35 ml	0.35 ml
Temed	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Volumen final	45 ml	45 ml	45 ml

Soluciones	Gel Concentrador
	3%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	2.2 ml
0.5 M Tris pH 6.8	4.9 ml
dH <sub>2</sub> O	12.5 ml
SDS 10%	0.2 ml
APS 10%	0.25 ml
Temed	15 $\mu$ l
Volumen final	20 ml

**Solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30 % : 0.8 %):**

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml.  
Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1.

Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

**Soluciones y reactivos para geles de Acrilamida (SDS-PAGE):**

**1.5 M de Tris-HCl pH 8.8:** 18.15 g de Tris base/100 ml de agua desionizada.

**0.5 M de Tris-HCl pH 6.8:** 6 g de Tris base/ 100 ml de agua desionizada.

**10 % de SDS:** 100 g de SDS en 1 litro de agua.

**APS 10 %:** 1 g de Persulfato de Amonio en 10 ml de agua. Alicuotar y congelar a -20°C. Alícuota en uso almacenar a 4°C.

**Buffer de electroforesis SDS PAGE (corrida- running buffer) 10 X ph 8.3:**

Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS 10 %	100 ml

Aforar a un litro de agua desionizada, almacenar a Temperatura ambiente. No ajustar pH. Diluir a 1 X antes de usar.

Nota: Correr a 60 volt, hasta que el Azul de bromofenol (frente de corrida) pase al gel de separación. Aumentar a 120 volt para la separación de las proteínas.

**TEMED (Tetrametiletilendiamina):** Almacenar a 4°C

**Buffer de carga para proteínas:**

Tris-Cl 0.125 M pH 6.8  
SDS 4%  
Glicerol 20%  
Azul de bromofenol 0.02%

**Solución de tinción de geles de proteínas:**

Azul de Coomasie R-250 0.025%,  
Ac. Acético 7%  
Metanol 40%

**Solución de desteñido I**

Ac. Acético 7%  
Metanol 40%

**Solución de desteñido II**

Ac. Acético 7%  
Metanol 5%

**Buffer de transferencia para Western Blot**

Trizma- base	25mM	3.03 g
Glicina	190mM	14.25 g
Metanol	20%	200 ml

Disolver primero el Trizma y Glicina. Una vez disuelto agregar el metanol y aforar a 1 litro con agua destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

**PBS 1x**

NaCl (MERCK)	8g
KCl	8g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.65g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

Se ajusto el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave.

**PBS – EDTA 0.2%**

PBS 1X p 7.0	500 ml
EDTA 1g	

Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave 121°C/ 20 min

**TBE 1X**

Tris base	54 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20ml

Se ajusto el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave.

### **Extracción de RNA de líneas celulares con Trizol**

Resuspender pastilla en 500  $\mu$ l de trizol. Pipetear y colocar en microtubo de 1.5 ml. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Anadir 300  $\mu$ l de cloroformo, mezclar por inmersión suave 2-3 veces. Incubar durante 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 3 min a 4C 12,000 rpm.

Separación de fases. Acuosa (superior): RNA

Interfase (media): DNA

Orgánica (fondo): Trizol, lípidos, proteínas, etc

Recuperar la fase acuosa sin contaminarla (aprox 300  $\mu$ l), colocarla en microtubo de 1.5 ml nuevo. Adicionar 800  $\mu$ l de isopropanol, mezclar por inversión 3-4 veces Incubar 10 min a temp ambiente. Centrifugar 10 min a 4C 12,000 rpm. Decantar el sobrenadante y secar la pastilla durante 5 min a temp ambiente. Resuspender la pastilla en 100  $\mu$ l de TE, agua de ampolleta o agua DEPC. Correr en agarosa para evaluar RNA total

### **Buffer para extracción de proteínas TNTE (Tris-NaCl-Triton-EDTA)**

Tris 50 mM (pH 7.4)

NaCl 150 mM

Triton 0.1% al 0.5%

EDTA 1mM

Almacenar 4°C

Lavar las células 3 veces con 5 ml de PBS frío en agitación durante 5 min cada ocasión. Aspirar el buffer y agregar un ml de TNTE frio más inhibidores Dejar en agitación 15 min a 4°C. Recuperar sobrenadante a un tubo nuevo.

Alicuotar y congelar en el revco a - 70°C.

**PCR a partir de DNA genómico****PCR-mix (x1)**

<u>Reactivos</u>	<u>Stock</u>	<u>Concentración final</u>
PCR- <i>buffer</i> 10x	2.5 µl	1x (2 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs 10x (2 mM )	2.5 µl	0.2 mM
Oligo 1 100 µM	0.125 µl	0.5 µM (=0.5 pmol/µl)
Oligo 2 100 µM	0.125 µl	0.5 µM (=0.5 pmol/µl)
Taq-polimerasa (3-5 U/µl)	0.25 µl	0.75-1.25 U/reacción
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Aforar a 24 µl	
Total=	24 µl	
Añadir	+1 µl <b>DNA</b> (200 ng)	
Volumen final =	25 µl	
Controles :	Negativo	1 µl H <sub>2</sub> O
	Positivo	1 µl Plásmido (2-5 pg/µl)

**Programa de amplificación**

(Para tubos de PCR de 0.2 ml en Termociclador con tapa calefactora y sin aceite)

NOTA: para oligonucleótidos con T<sub>m</sub> ≥ 65 °C, de 25 a 30 nucleótidos, y banda de PCR ≤ 2 kb

35x	{	2'	94 °C
		30''	94 °C
		30''	65 °C
		2'	72 °C
		10'	72 °C
	∞	4 °C	

**Geles de agarosa para ácidos nucleicos**

Gel de electroforesis de agarosa/TAE al 1-2% (según tamaño del fragmento de PCR). Añadir 5 µl de SBx6 (*Sample Buffer x6*) a los 25 µl de volumen final y cargar en el gel 10-20 µl.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- National Cancer Institute. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- 2.- Martínez J. L. Cancer de mama. *Boletín de práctica médica efectiva*. INSP. 2008. Secretaría de Salud. México.
- 3.- Dorland Newman W. A. Diccionario enciclopédico ilustrado de medicina: Más de cien años de historia. McGraw-Hill Interamericana de España, 2005. ISBN: 8481747904, 9788481747904. pp.2210
- 4.- MASSON VV.AA. DICCIONARIO MEDICO. Ed. MASSON Barcelona 1998. ISBN: 9788445804865. pp 768.
- 5.- <http://www.who.int/es/>
- 6.- Rudson RW. *Cancer Biology*. 2007. Oxford. University Press Inc. Fourth edition. 545 pp. ISBN-13: 978-0-19-517543-1
- 7.- Cotran R. S, Robbins S. L, y Kumar V. *Patología Estructural y Funcional*. Mc-Graw Hill, 6ª ed. 1999.
- 8.- Devi PU. Basics of carcinogenesis. 2005. *Health Administrator*. 17(1): 16-24.
- 9.- Hennings H, Glick AB, Greenhalgh DA, Morgan DL, Strickland JE, Tennenbaum T, Yuspa SH. Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal carcinogenesis. 1993. *Exp Biol Med*. 202:1-8
- 10.- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. 2009. *Nature* 458, 719-724. doi:10.1038/nature07943
- 11.- Bishop JM. The molecular genetics of cancer. 1987. *Science* 235: 305-311
- 12.- Loeb LA. Harris CC. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective 2008. *Cancer Res*. September 1; 68(17): 6863–6872
- 13.- Clayson DB, Mehta R, Iverson F. Oxidative DNA damage - The effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. 1994. *Mutat. Res*. 317, 25-42.
- 14.- Cox R. Mechanisms of radiation oncogenesis. 1994. *Int. J. Radiat. Biol*. 65: 57-64.
- 15.- Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A. Viral infections as a cause of cáncer. 2007. *Int J Oncol*. 30(6):1521-1528.
- 16.- Gunduz M, Gunduz E. Breast Cancer – Carcinogenesis, Cell Growth and Signaling Pathways. 2011. Ed. In Tech. 744 pp. ISBN 978-953-307-714-7.
- 17.- Martín de Civetta MT, Civetta JD. Carcinogénesis. 2011. *Salud Publica Mex*. 53:405-414.
- 18.- Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. 2011. *Cell Cycle*. 10 (17): 2865-2873

- 19.- Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, Seymour SL, Argast GM, Epstein DM, Haley JD. A systems view of epithelial–mesenchymal transition signaling states. 2011. *Clin Exp Metastasis*. 28:137–155
- 20.- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. 2013. *J. Clin. Invest*. 119:1420–1428
- 21.- Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGFbeta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2009; 21: 166–176
- 22.- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. 2003. *Nature Reviews Cancer* 3, 453-458
- 23.- Cancer Mondial, International Agency for Research on Cancer, IARC, <http://www-dep.iarc.fr>
- 24.- CI5 I-VIII (Cancer Incidence in Five Continents)
- 25.- Gómez H. Vázquez J. L. Fernández S. 2003. Detección de Cáncer de Mama en las mujeres derechohabientes del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud, 2000. Instituto Mexicano del Seguro Social. División Técnica de Información Estadística en Salud.
- 26.- INEGI, Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos, eds. 1999- 2005, (<http://www.inegi.gob.mx/>).
- 27.- Salud Integral para la Mujer A.C. <http://www.sipam.org.mx>
- 28.- Brandan M. E. Villaseñor Y. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*. 2006. 1: 147-162.
- 29.- Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cervix en México entre 1979 y 2006. *Salud Publica Mex*. 2009; 51 supl 2:s208-s219.
- 30.- Key T. J. Verkasato P.K. Banks E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet. Oncology*. 2001. 2(3):1-18
- 31.- La Vecchia C. Menopause, hormone therapy and breast cancer risk. *European J Cancer Prevention*. 2003.12:437-438.
- 32.- Romieu I. Hernández M. Lazcano E. Breast cancer and lactation history in Mexican women. *Am. J. Epidemiol*. 1996. 143 (6):543-552.
- 33.- Falkenberg S. S. Legare R. D. Risk factors for breast cancer. *Obst and Gyn Clin*. 2002. 29(1)
- 34.- Calderon-Garcidueñas A. L. Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex*. 2000. 42:26-33.
- 35.- DeVita V. T. Hellman S. Rosenberg S. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 2004. 7th Ed.
- 36.- Noriega Y. Langley E. Correguladores del Receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología*. 2008. 3: 29-40



- 37.- Netter FH. Atlas de anatomía humana. 2011. 5ª Ed. Elsevier masson. 624 pp. ISBN 9788445817599.
- 38.- Secretaria de Salud de México. Compendio de anatomía patológica de la glándula mamaria. 2002. 1ª Edición. 125 pp. ISBN 970-721-093-1
- 39.- <http://tgmouse.ucdavis.edu/JENSEN-MAMM2000/NORMAL-LA/slide27.jpg>
- 40.- Arraztoa J. La mama diagnostico y tratamiento. 2 edición. Ed, Mediterraneo.
- 41.- Howard BA, Gusterson BA. Human breast development. 2000. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 5(2): 119-137.
- 42.- Sebastian J, Richards RG, Walker MP, Wiesen JF, Werb Z, Derynck R, Hom YK, Cunha GR, Di Augustine RP. Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. 1998. *Cell Growth Differ*. 9:777-785.
- 43.- Hidalgo-Miranda A. Jimenez Sánchez G. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud publica de México*. Vol. 51 suplemento 2 de 2009. 197-207.
- 44.- Bartel, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. 2004. *Cell*. 116: 281-297.
- 45.- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. 1993. *Cell* 75, 843-854.
- 46.- Shabalina SA, Koonin EV. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. 2008. *Trends Ecol Evol*. 23(10): 578-587.
- 47.- Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. 2007. *Nature* 447:1126-1129. doi:10.1038
- 48.- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 2005; 120: 21-24.
- 49.- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
- 50.- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431: 350-355.
- 51.- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. 2012. *Nature Reviews Genetics*. 13: 358-369. doi:10.1038/nrg3198
- 52.- Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. 2012. *J Clin Diagn Res*. 6(10):1791-1795. doi: 10.7860/JCDR/2012/4901.2653.
- 53.- Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. 2012. *Cell Res*. 22(1):107-26. doi: 10.1038/cr.2011.158
- 54.- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. 2004. *EMBO J* 23: 4051-4060.

- 55.- Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. 2007. *PLoS Comput Biol.* 3(3):e37.
- 56.- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 432 (7014) : 231-5.
- 57.- Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- 58.- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 2004: Vol. 303. no. 5654, pp. 95 – 98.
- 59.- Thimmaiah P, Chendrimada Richard I, Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura & Ramin Shiekhattar. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744
- 60.- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 2005 Nov 18;123(4):621-9.
- 61.- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel J, Fritzler M, Chan E (2005). «Disruption of P bodies impairs mammalian RNA interference» *Nat Cell Biol.* Vol. 7. n.º 12. pp. 1267–74
- 62.- López-Camarillo C, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Azuara-Liceaga E, Pérez-Plasencia C, Fuentes-Mera L, Fonseca-Sánchez MA, Flores-Pérez A. Functional roles of microRNAs in cancer: microRNomes and oncomiRs connection. 2013. *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*, Edition: 1a. Publisher: In Tech Publishers. ISBN: 980-953-307-479-0
- 63.- Hutvagner G, Zamore PD: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002, 297:2056–2060
- 64.- Johnston RJ, Hobert O: A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003, 426:845–849
- 65.- Brennecke J, Hipfner D, Stark A, Russell R, Cohen S: Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 2003, 113:25–36
- 66.- Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol.* 2005 Apr;17(2):155-65.
- 67.- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni L: A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell.* 2005, 123:819–831
- 68.- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006, 38:228–233
- 69.- Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS: Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006, 24:857–864

- 70.- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R: MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004, 279:52361–52365
- 71.- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:13944–13949
- 72.- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005, 435:828–833
- 73.- Ma L, Weinberg RA. (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet.* Vol. Jul 30
- 74.- Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1277-81.
- 75.-Wenyong Zhang, James E. Dahlberg, and Wayne Tam. MicroRNAs in Tumorigenesis: A Primer The American Journal of Pathology, Vol. 171, No. 3, September 2007
- 76.- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004
- 77.- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. 2003. Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1: 882–891.
- 78.- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, et al. 2004. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci* 101:11755–11760.
- 79.- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, et al. 2005. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 353: 1793–1801.
- 80.- Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. 2005. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1351–1358.
- 81.- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, et al. 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 102: 19075–19080
- 82.- Iorio MV, Ferracin M, Chang-Gong L, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Meinard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, and Carlo M. Croce. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2005; 65: (16) 7065-7070.
- 83.- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, 435:834–838.
- 84.- Calin GA, Croce CM. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Natl Rev* 6: 857–866

- 85.- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25: 2537–2545.
- 86.- Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, et al. 2006. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 13: 497–508.
- 87.- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, et al. 2006. Micro-RNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 24: 4677–4684.
- 88.- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, et al. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2257–2261.
- 89.- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, et al. 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189–198.
- 90.- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297: 1901–1908.
- 91.- Levi F, Bosetti C, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe. *Eur. J. Cancer Prevention*. 2005. 14(6): 497-502.
- 92.-Valladares A. Salamanca F. Madrigal-Bujaidar E. Arenas D. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004. 152:163-166.
- 93.- García N. Salamanca F. Astudillo-De la Vegas H. Curiel-Quesada E. Alvarado I. Peñaloza R. A molecular analysis by gene profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer*. 2005. 5:93.
- 94.- Valladares A. García N. Salamanca F. Curiel-Quezada E. Madrigal-Bujaidar E. Vergara M. D. Genetic expression profiles and chromosomal alterations in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Cytogenetic*. 2006. 170:147-151.
- 95.- Perou C. M. Sorlie T, Eisen M. B. van de Rijn M. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000. 406:747–752.
- 96.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival. An overview of the randomized trials. *Lancet*. 2005. 365:1687-1717.
- 97.- Liu R, et al. Gene signature linked to breast cancer survival. *N Engl J Med*. 2007. 356:217-226, 294.
- 98.- Ribeiro-Silva A. Ramalho L. N. Garcia S. B. Brandao D. F. Chahud S. Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 2005. 47:458-466.

- 99.- Paik S. Shak S. Tang G. A multigene-assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004. 351: 2817-2826.
- 100.- Habel L. A. Shak S. Jacobs M. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006. 8:R25 (Available on line).
- 101.- Van de Vijver M. J. He Y. D. van'T Veer L. J. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002. 347:1999-2009.
- 102.- Foekens J. A. Atkins D. Zhang Y. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006. 24:1665-1671.
- 103.- Rodríguez-Cuevas S. A. Luna J. P. Impacto de las firmas genómicas en la decisión terapéutica del cáncer de mama. *Cir Ciruj*. 2007;75:415-417.
- 104.- Driscoll L. O' Clynes M. Biomarkers and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2006. 6, 365-384.
- 105.- Sorlie T. Perou C. M. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001. 98:10869-10874.
- 106.- Esteva F. J. and Hortobagyi G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004. 6:109-118.
- 107.- Ross J. S. Fletcher J. A. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998. 16:413-28.
- 108.- Vogelstein B. Kinzler K. Cancer genes and the pathways they Control. *Nature medicine*. 2004. 10, 8.
- 109.- Vogelstein B. Kinzler K. Cancer genes and the pathways they Control. *Nature medicine*. 2004. 10, 8.
- 110.- Hollstein M. Sidransky D. Vogelstein B. Harris C.C. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991. 253:49-53.
- 111.- Rodríguez-Cuevas S. A. Labastida S. A. Tapia R. Kuri P. Macías C. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Población derechohabiente del IMSS 1991-1996. *Ciencia y Cultura Latinoamericana*, México D.F. 1999 pp 56.
- 112.- Conrad D. H. Goyette J. Thomas P. S. Proteomics as a Method for Early Detection of Cancer: A Review of Proteomics, Exhaled Breath Condensate, and Lung Cancer Screening. 2007. *J Gen Intern Med* 23(Suppl 1):78-84
- 113.- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004, 64:3753-3756
- 114.- Michael D Mattie\*1, Christopher C Benz4, Jessica Bowers2, Kelly Sensinger2, Linda Wong3, Gary K Scott4, Vita Fedele1, David Ginzinger3, Robert Getts2 and Chris Haqq. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer* 2006, 5:24.

- 115.- Lowery A.J, et al., "Micro-RNA expression profiling in primary breast tumours," *European Journal of Cancer*, vol. 5, supplement 3, 2007.
- 116.- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavare S, Caldas C, Miska EA: MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007, 8:R214
- 117.- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J. 2008. Endogenous human micro-RNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147–152.
- 118.- Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol*. 2008 Aug 21;9:76. doi: 10.1186/1471-2199-9-76.
- 119.- Hurst DR, Edmonds MD, and Welch DR. Metastamir: The Field of Metastasis Regulatory microRNA Is Spreading. *Cancer Res* 2009; 69: (19). October 1, 2009
- 120.- Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009;13:39–53.
- 121.- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY: MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007, 282:14328–14336
- 122.- Li-xu yan, xiu-fang huang, qiong shao, ma-yan huang, ling deng, Qiu-liang wu, yi-xin zeng, and jian-yong shao. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* (2008), 14:2348–2360
- 123.- Marilena V. Iorio, Patrizia Casalini, Claudia Piovan, Gianpiero Di Leva, Andrea Merlo, Tiziana Triulzi, Sylvie Me´nard, Carlo M. Croce, and Elda Tagliabue. microRNA-205 Regulates HER3 in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2009; 69: (6). March 15, 2009
- 124.- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593–601.
- 125.- Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008;22:894–907.  
Mini Review
- 126.- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005, 120:635–647
- 127.- Marcus E. Peter. Let-7 and miR-200 microRNAs: Guardians against pluripotency and cancer progression *Cell Cycle*. 2009 March 15; 8(6): 843–852.
- 128.- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA: Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007, 449:682-688.
- 129.- Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, Nuovo G, Marsh CB, Nana-Sinkam SP. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373:607–12

- 130.- Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R: The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008, 10:292-210.
- 131.- Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009; 137:1032–46.
- 132.- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481–6.
- 133.- Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(42):5643-7. doi: 10.1038/onc.2008.171. Epub 2008 May 26.
- 134.- Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S, et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res*. 2009;1269:158–65.
- 135.- Li Y, Vandenboom 2nd TG, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70(4):1486–95
- 136.- Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, Bautista-Piña V, Arellano-Llamas R, Hidalgo-Miranda A. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(3):e31904. doi: 10.1371/journal.pone.0031904. Epub 2012 Mar 16.
- 137.- Sarver AL, Thayanithy V, Scott MC, Cleton-Jansen AM, Pancras CW Hogendoorn P, Modiano JF, Subramanian S. (2013). MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013, 8:7
- 138.- Selcuklu SD, Yakicier MC, Erson AE. An investigation of microRNAs mapping to breast cancer related genomic gain and loss regions. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 Feb;189(1):15-23. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.09.009.
- 139.- Zheng Y, Yin L, Chen H, Yang S, Pan C, Lu S, Miao M, Jiao B. (2012). miR-376a suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters* 586(16): 2396-2403.
- 140.- Deng M, Tang H, Zhou Y, Zhou M, Xiong W, Zheng Y, Ye Q, Zeng X, Liao Q, Guo X, Li X, Ma J, Li G. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma. *J Cell Sci*. 2011 Sep 1;124(Pt 17):2997-3005.
- 141.- Kim SY, Lee YH, Bae YS. miR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760 cooperatively induce cellular senescence by targeting  $\alpha$  subunit of protein kinase CKII in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 5. doi:pii:
- 142.- Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, Sakurai D, Horiguchi S, Okamoto Y, Seki N. miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). *Br J Cancer*. 2010 Sep 7;103(6):877-84.
- 143.- Cheung TH, Quach NL, Charville GW, Liu L, Park L, Edalati A, Yoo B, Hoang P, Rando TA. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*. 2012 Feb 23;482(7386):524-8. doi: 10.1038/nature10834

- 144.- Zehavi L, Avraham R, Barzilai A, Bar-Ilan D, Navon R, Sidi Y, Avni D, Leibowitz-Amit R. Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer*. 2012 Jul 2;11:44.
- 145.- Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Dangwal S, Kumarswamy R, Bang C, Holzmann A, Remke J, Caprio M, Jentzsch C, Engelhardt S, Geisendorf S, Glas C, Hofmann TG, Nessling M, Richter K, Schiffer M, Carrier L, Napp LC, Bauersachs J, Chowdhury K, Thum T. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Commun*. 2012 Sep 25;3:1078.
- 146.- Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):518-23. Epub 2011 Feb 15.
- 147.- Alvarez-Saavedra M, Antoun G, Yanagiya A, Oliva-Hernandez R, Comejo-Palma D, Perez-Iratxeta C, Sonenberg N, Cheng HY. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2011 Feb 15;20(4):731-51.
- 148.- Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F, Boshoff C. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):513-9.
- 149.- Du L, Subauste MC, DeSevo C, Zhao Z, Baker M, Borkowski R, Schageman JJ, Greer R, Yang CR, Suraokar M, Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD, Pertsemliadis A. miR-337-3p and its targets STAT3 and RAP1A modulate taxane sensitivity in non-small cell lung cancers. *PLoS One*. 2012;7(6):e39167.
- 150.- Zehavi L, Avraham R, Barzilai A, Bar-Ilan D, Navon R, Sidi Y, Avni D, Leibowitz-Amit R. Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer*. 2012 Jul 2;11:44
- 151.- Zheng Y, Yin L, Chen H, Yang S, Pan C, Lu S, Miao M, Jiao B. miR-376a suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett*. 2012 Jul 30;586(16):2396-403.
- 152.- Wang F, Yu J, Yang GH, Wang XS, Zhang JW. Regulation of erythroid differentiation by miR-376a and its targets. *Cell Res*. 2011 Aug;21(8):1196-209. doi: 10.1038/cr.2011.79.
- 153.- Huang Z, Huang S, Wang Q, Liang L, Ni S, Wang L, Sheng W, He X, Du X. MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2582-9.
- 154.- Li D, Wang Q, Liu C, Duan H, Zeng X, Zhang B, Li X, Zhao J, Tang S, Li Z, Xing X, Yang P, Chen L, Zeng J, Zhu X, Zhang S, Zhang Z, Ma L, He Z, Wang E, Xiao Y, Zheng Y, Chen W. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo(a)pyrene-induced human cell transformation. *Toxicol Sci*. 2012 Feb;125(2):382-91
- 155.- Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang KT. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein



1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 2008 Nov 1;68(21):8976-85.

156.- Yang C, Cai J, Wang Q, Tang H, Cao J, Wu L, Wang Z. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol.* 2012 Feb;124(2):325-34.

157.- Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, Sakuragi N. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene.* 2012 Jul 30.

158.- Tessel MA, Benham AL, Krett NL, Rosen ST, Gunaratne PH. Role for microRNAs in regulating glucocorticoid response and resistance in multiple myeloma. *Horm Cancer.* 2011 Jun;2(3):182-9

159.- Suresh S, McCallum L, Lu W, Lazar N, Perbal B, Irvine AE. MicroRNAs 130a/b are regulated by BCR-ABL and downregulate expression of CCN3 in CML. *J Cell Commun Signal.* 2011 Aug;5(3):183-91

160.- Wu L, Cai C, Wang X, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Lett.* 2011 May 6;585(9):1322-30.

161.- Wang XS, Gong JN, Yu J, Wang F, Zhang XH, Yin XL, Tan ZQ, Luo ZM, Yang GH, Shen C, Zhang JW. MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012 May 24;119(21):4992-5004.

162.- Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, Malter C, Nieves E, Tawara I, Wang Y, Ward PA, Chinnaiyan A, Reddy P. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6172-83.

163.- Robin TP, Smith A, McKinsey E, Reaves L, Jedlicka P, Ford HL. EWS/FLI1 regulates EYA3 in Ewing sarcoma via modulation of miRNA-708, resulting in increased cell survival and chemoresistance. *Mol Cancer Res.* 2012 Aug;10(8):1098-108. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0086.

164.- Saini S, Majid S, Shahryari V, Arora S, Yamamura S, Chang I, Zaman MS, Deng G, Tanaka Y, Dahiya R. miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 2012 Jul 15;72(14):3618-30.

165.- Saini S, Yamamura S, Majid S, Shahryari V, Hirata H, Tanaka Y, Dahiya R. MicroRNA-708 induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in renal cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Oct 1;71(19):6208-19

166.- Leivonen SK, Mäkelä R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, Enerly E, Aakula A, Hellström K, Sahlberg N, Kristensen VN, Børresen-Dale AL, Saviranta P, Perälä M, Kallioniemi O. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene.* 2009 Nov 5;28(44):3926-36.

167.- He X, DiMeco F, Vescovi AL, Heth JA, Muraszko KM, Fan X. Mir-18b regulates glioblastoma neurosphere growth through notch2, nedd9, and mekk1. *SC-14. Neuro Oncol* (2012) 14 (suppl 6): vi142-vi152. doi: 10.1093/neuonc/nos239.

- 168.- Fang L, Du WW, Yang X, Chen K, Ghanekar A, Lewy G, Yang W, Yee AJ, Lu WY, Xuan JW, Gao Z, Xie F, He C, Deng Z, Yang BB. Versican 3'-untranslated region (3'-UTR) functions as a ceRNA in inducing the development of hepatocellular carcinoma by regulating miRNA activity. *FASEB J*. 2012 Nov 24. [Epub ahead of print]
- 169.- Chen Z, Chen LY, Dai HY, Wang P, Gao S, Wang K. miR-301a promotes pancreatic cancer cell proliferation by directly inhibiting Bim expression. *J Cell Biochem*. 2012 Oct;113(10):3229-35.
- 170.- Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, Young KH, Martin R, Li Y. miR-301a as an NF- $\kappa$ B activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J*. 2011 Jan 5;30(1):57-67.
- 171.- Epis MR, Giles KM, Kalinowski FC, Barker A, Cohen RJ, Leedman PJ. Regulation of Expression of Deoxyhypusine Hydroxylase (DOHH), the Enzyme That Catalyzes the Activation of eIF5A, by miR-331-3p and miR-642-5p in Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2012 Oct 12;287(42):35251-9.
- 172.- White NM, Youssef YM, Fendler A, Stephan C, Jung K, Yousef GM. The miRNA-kallikrein axis of interaction: a new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biol Chem*. 2012 Apr 1;393(5):379-89.
- 173.- Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, Leedman PJ. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2009 Sep 11;284(37):24696-704.
- 174.- Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Zhang J, Chen X, Cai Q, Li J, Gu Q, Liu B, Zhu Z, Yu Y. miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 16;398(1):1-6.
- 175.- Li F, Adam L, Vadlamudi RK, Zhou H, Sen S, Chernoff J, Mandal M, Kumar R. Activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep*. 2002 Aug;3(8):767-73. Epub 2002 Jul 15.
- 176.- Lindemann RK, Braig M, Ballschmieter P, Guise TA, Nordheim A, Dittmer J. Protein kinase Calpha regulates Ets1 transcriptional activity in invasive breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2003 Apr;22(4):799-805.
- 177.- Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21;277(25):22558-65. Epub 2002 Apr 17.
- 178.- Yuan K, Chung LW, Siegal GP, Zayzafoon M. alpha-CaMKII controls the growth of human osteosarcoma by regulating cell cycle progression. *Lab Invest*. 2007 Sep;87(9):938-50. Epub 2007 Jul 16.
- 179.- Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Hieter P. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4;105(9):3443-8. doi: 10.1073/pnas.0712384105. Epub 2008 Feb 25.
- 180.- Wang Y, Li ZF, He J, Li YL, Zhu GB, Zhang LH, Li YL. Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Oct;22(10):1179-84. Epub 2007 Apr 18.

- 181.- Uekita T, Tanaka M, Takigahira M, Miyazawa Y, Nakanishi Y, Kanai Y, Yanagihara K, Sakai R. CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am J Pathol.* 2008 Jun;172(6):1729-39. doi: 10.2353/ajpath.2008.070981. Epub 2008 May 8.
- 182.- Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mansel RE. Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2006 Apr;17(4):583-90.
- 183.- Wang J, Chen G, Pantopoulos K. Inhibition of transferrin receptor 1 transcription by a cell density response element. *Biochem J.* 2005 Dec 1;392(Pt 2):383-8.
- 184.- Kano S, Miyajima N, Fukuda S, Hatakeyama S. Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5572-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6231.
- 185.- Mitsui Y, Mochizuki S, Kodama T, Shimoda M, Ohtsuka T, Shiomi T, Chijiwa M, Ikeda T, Kitajima M, Okada Y. ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9913-20.
- 186.- Srivastava M, Torosyan Y, Raffeld M, Eidelman O, Pollard HB, Bubendorf L. ANXA7 expression represents hormone-relevant tumor suppression in different cancers. *Int J Cancer.* 2007 Dec 15;121(12):2628-36.
- 187.- Irminger-Finger I, Leung WC, Li J, Dubois-Dauphin M, Harb J, Feki A, Jefford CE, Soriano JV, Jaconi M, Montesano R, Krause KH. Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis. *Mol Cell.* 2001 Dec;8(6):1255-66.
- 188.- Peirce SK, Chen WY. Human prolactin and its antagonist, hPRL-G129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice. *Oncogene.* 2004 Feb 12;23(6):1248-55.
- 189.- Tommasi S, Pilato B, Pinto R, Monaco A, Bruno M, Campana M, Digennaro M, Schittulli F, Lacalamita R, Paradiso A. Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutat Res.* 2008 Sep 26;644(1-2):64-70. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.005. Epub 2008 Jul 18.
- 190.- Sieuwerts AM, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Timmermans M, Trapman AM, Garcia RR, Arnold M, Goedheer AJ, de Weerd V, Portengen H, Klijn JG, Foekens JA. Which cyclin E prevails as prognostic marker for breast cancer? Results from a retrospective study involving 635 lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3319-28.
- 191.- Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjälöski K, Ojala S, Kilpivaara O, Tamminen A, Kononen J, Aittomäki K, Heikkilä P, Holli K, Blomqvist C, Bartek J, Kallioniemi OP, Nevanlinna H. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2002 Aug;71(2):432-8. Epub 2002 Jul 28.
- 192.- Tirado Y, Williams MD, Hanna EY, Kaye FJ, Batsakis JG, El-Naggar AK. CRTC1/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin's tumors: implications for histogenesis and biologic behavior. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Jul;46(7):708-15.
- 193.- Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prébois C, Beaujouin M, Glondu M, Noël A, Alvarez-Gonzalez ML, Blacher S, Coopman P, Baghdiguian S, Gilles C, Loncarek J, Freiss G, Vignon F, Liaudet-Coopman E. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol.* 2005 Jan 31;168(3):489-99.

- 194.- Wu Q, Li Z, Lin H, Han L, Liu S, Lin Z. DEK overexpression in uterine cervical cancers. *Pathol Int*. 2008 Jun;58(6):378-82. doi: 10.1111/j.1440-1827.2008.02239.x.
- 195.- Qiu GH, Salto-Tellez M, Ross JA, Yeo W, Cui Y, Wheelhouse N, Chen GG, Harrison D, Lai P, Tao Q, Hooi SC. The tumor suppressor gene DLEC1 is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G1 arrest in cell cycle. *J Hepatol*. 2008 Mar;48(3):433-41. doi: 10.1016/j.jhep.2007.11.015. Epub 2007 Dec 31.
- 196.- Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te Poele R, Giddings I, Merson S, Cooper CS. Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007 Feb 15;26(7):1028-37. Epub 2006 Aug 14.
- 197.- Jiang W, Li X, Rao S, Wang L, Du L, Li C, Wu C, Wang H, Wang Y, Yang B. Constructing disease-specific gene networks using pair-wise relevance metric: application to colon cancer identifies interleukin 8, desmin and enolase 1 as the central elements. *BMC Syst Biol*. 2008 Aug 10;2:72. doi: 10.1186/1752-0509-2-72.
- 198.- Moffa AB, Tannheimer SL, Ethier SP. Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells. *Mol Cancer Res*. 2004 Nov;2(11):643-52.
- 199.- Shaffer JM, Smithgall TE. Promoter methylation blocks FES protein-tyrosine kinase gene expression in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Mar;48(3):272-84. doi: 10.1002/gcc.20638.
- 200.- Rae JM, Johnson MD, Scheys JO, Cordero KE, Larios JM, Lippman ME. GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jul;92(2):141-9.
- 201.- Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1380-5.
- 202.- Laud K, Gourdou I, Pessemeesse L, Peyrat JP, Djiane J. Identification of leptin receptors in human breast cancer: functional activity in the T47-D breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 25;188(1-2):219-26.
- 203.- Osaki M, Inoue T, Yamaguchi S, Inaba A, Tokuyasu N, Jeang KT, Oshimura M, Ito H. MAD1 (mitotic arrest deficiency 1) is a candidate for a tumor suppressor gene in human stomach. *Virchows Arch*. 2007 Oct;451(4):771-9. Epub 2007 Aug 3.
- 204 Peng Y, Li CX, Chen F, Wang Z, Ligr M, Melamed J, Wei J, Gerald W, Pagano M, Garabedian MJ, Lee P. Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):225-35. Epub 2007 Dec 21.
- 205.- Kim SS, Yoo NJ, Jeong EG, Kim MS, Lee SH. Expression of NEDD4-1, a PTEN regulator, in gastric and colorectal carcinomas. *APMIS*. 2008 Sep;116(9):779-84.
- 206.- Hayward DG, Clarke RB, Faragher AJ, Pillai MR, Hagan IM, Fry AM. The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Oct 15;64(20):7370-6.
- 207.- Florena AM, Tripodo C, Guarnotta C, Ingrao S, Porcasi R, Martorana A, Lo Bosco G, Cabibi D, Franco V. Associations between Notch-2, Akt-1 and HER2/neu expression in invasive

- human breast cancer: a tissue microarray immunophenotypic analysis on 98 patients. *Pathobiology*. 2007;74(6):317-22. Epub 2007 Dec 13.
- 208.- Kikugawa T, Kinugasa Y, Shiraishi K, Nanba D, Nakashiro K, Tanji N, Yokoyama M, Higashiyama S. PLZF regulates Pbx1 transcription and Pbx1-HoxC8 complex leads to androgen-independent prostate cancer proliferation. *Prostate*. 2006 Jul 1;66(10):1092-9.
- 209.- Jackson JG, Pereira-Smith OM. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(7):2501-10.
- 210.- M. Tatsuguchi, H.Y. Seok, T.E. Callis, J.M. Thomson, J.F. Chen, M. Newman, M. Rojas, S.M. Hammond, D.Z. Wang, Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy, *J Mol Cell Cardiol*. 42 (2007) 1137-1141.
- 211.- D. Otaegui, S.E. Baranzini, R. Armañanzas, B. Calvo, M. Muñoz-Culla, P. Khankhanian, I. Inza, J.A. Lozano, T. Castillo-Triviño, A. Asensio, J. Olaskoaga, A. Lopez de Munain, Differential micro RNA expression in PBMC from múltiple sclerosis patients, *PLoS ONE*. 4 (2009) e6309.
- 212.- Z.Z. Zhang, X. Liu, D.Q. Wang, M.K. Teng, L.W. Niu, A.L. Huang, Z. Liang, Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level, *World Gastroenterol*. 17 (2011) 3353-3358.
- 213.- J. Guo, Y. Miao, B. Xiao, R. Huan, Z. Jiang, D. Meng, Y. Wang, Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues, *J Gastroenterol and Hepatol*. 24 (2009) 652-657.
- 214.- T.H. Kim, Y.K. Kim, Y. Kwon, J.H. Heo, H. Kang, G. Kim, H.J. An, Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours, *Histopathology*. 57 (2010) 734-743.
- 215.- M. Sand, M. Skrygan, D. Sand, D. Georgas, S.A. Hahn, T. Gambichler, P. Altmeyer, F.G. Bechara, Expression of microRNAs in basal cell carcinoma, *Br J Dermatol*. 167 (2012) 847-855.
- 216.- Y.X. Wang, X.Y. Zhang, B.F. Zhang, C.Q. Yang, X.M. Chen, H.J. Gao, Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis, *J Digestive Dis*. 11 (2010) 50-54.
- 217.- X. He, F. DiMeco, A. Vescovi, J. Heth, K. Muraszko, X. Fan, SC14, MIR-18b decreases self-renewal of glioblastoma cancer stem-like cells through targeting NOTCH2, NEDD9, and MEK1, *Neuro Oncol* (2012) 14 (suppl 6): vi142-vi152. doi: 10.1093/neuonc/nos239.
- 218.- S.K. Leivonen, R. Makela, P. Ostling, P. Kohonen, S. Haapa-Paananen, K. Kleivi, E. Enerly, A. Aakula, K. Hellstrom, N. Sahlberg, V.N. Kristensen, A.L. Borrensens-Dale, P. Saviranta, M. Perala, M. Kallionoemi, Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines, *Oncogene*. 28 (2009) 3926-3936.
- 219.- N. Yoshimoto, T. Toyama, S. Takahashi, H. Sugiura, Y. Endo, M. Iwasa, Y. Fujii, H. Yamashita, Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor  $\alpha$  in human breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*. 130 (2011) 331-9

- 220.- V.J. Cookson, M.A. Bentley, B.V. Hogan, K. Horgan, B.E. Hayward, L.D. Hazelwood, T.A. Hughes, Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNA within the tumours, *Cell Oncol.* 35 (2012) 301-308.
- 221.- T. Nakata, Y. Kitamura, K. Shimizu, S. Tanaka, M. Fujimori, S. Yokoyama, K. Ito, M. Emi, Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma, *Genes Chromosomes Cancer.* 25 (1999) 97-103.
- 222.- A.B.H. Bakker, J.H. Phillips, C.G. Figdor, L.L. Lanier, Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL, *J.Immunol.* 160 (1998) 5239-5245.
- 223.- W. Maat, A.R. van der Slik, D.H.L. Verhoeven, B.Z. Alizadeh, L.V. Ly, W. Verduijn, G.P.M. Luyten, A. Mulder, T. van Hall, F. Koning, M.J. Jager, J. van Bergen, Evidence for natural killer cell-mediated protection from metastasis formation in uveal melanoma patients, *IOVS.* 50 (2009) 2888-2895.
- 224.- K. Okada, E. Hirota, Y. Mizutani, T. Fujioka, T. Shuin, T. Miki, Y. Nakamura, T. Katagiri, Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas, *Cancer Sci.* 95 (2004) 949-954.
- 225.- S. Ohno, T. Kinoshita, Y. Ohno, T. Minamoto, N. Suzuki, M. Incue, T. Suda, Expression of NLRP7 (PYPAF3,NALP7) protein in endometrial cancer tissues, *Anticancer Res.* 28 (2008) 2493-2498.
- 226.- M. Coma, R. Vicente, S. Busquets, N. Carbó, M.M. Tamkun, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, A. Felipe, Impaired voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in brain during experimental cancer cachexia, *FEBS Letters.* 536 (2003) 45-50.
- 227.- S. Usami, S. Motoyama, S. Koyota, J. Wang, K. Hayashi-Shibuya, K. Maruyama, N. Takahashi, H. Saito, Y. Minamiya, S. Takasawa, J. Ogawa, T. Sugiyama, Regenerating gene I regulates interleukin-6 production in squamous esophageal cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 29 (2010) 4-8.
- 228.- K. Hayashi, S. Motoyama, S. Koyota, Y. Koizumi, J. Wang, S. Takasawa, A. Itaya-Hironaka, S. Sakuramoto-Tsuchida, K. Maruyama, H. Saito, Y. Minamiya, J. Ogawa, T. Sugiyama, REG I enhances chemo- and radiosensitivity in squamous cell esophageal cancer cells, *Cancer Sci.* 99 (2008) 2481-2485.
- 229.- A. Wisniewski, R. Jankowska, E. Passowicz-Muszynska, E. Wisniewska, E. Majorczyk, I. Nowak, I. Frydecka, P. Kusnierczyk, KIR2DL2/S2 and HLA-C C1C1 genotype is associated with better response to treatment and prolonged survival of patients with non-small cell lung cancer in a Polish Caucasian population, *Hum Immunol.* 73 (2012) 927-931.
- 230.- Z. Almalte, S. Samarani, A. Iannello, O. Debbeche, M. Duval, C. Infante-Rivard, D.K. Amre, D. Sinnett, D., A. Ahmad, Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia, *Blood.* 118 (2011) 1323-1328.
- 231.- A.P. Cumming, S.N. Hopmans, S. Vukmirovic-Popovic, W.C. Duivenvoorden, PSA affects prostate cancer cell invasion in vitro and induces an osteoblastic phenotype in bone in vivo, *Prostate Cancer Prostatics Dis.* 14 (2011) 286-94
- 232.- J.M. Mattson, A. Naryanen, U.H. Stenman, H. Koistinen, Peptides binding to prostate-specific antigen enhances its antiangiogenic activity, *Prostate.* 72 (2012) 1588-1594.

- 233.- P. Saxena, M. Trerotola, T. Wang, J. Li, A. Sayeed, J. Vanoudenhovet, D.S. Adams, T.J. Fitzgerald, D.C. Altieri, L.R. Languino, PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells, *Prostate*. 72 (2012) 769-776.
- 234.- T.A. O'Mara, C.M. Nagle, J. Batra, M.A. Kedda, J.A. Clements, A.B. Spurdle, Kallikrein-related peptidase 3 (KLK3/PSA) single nucleotide polymorphisms and ovarian cancer survival, *Twin Res Hum Genet*. 14 (2011) 323-327.
- 235.- M.H. Black, E.P. Diamandis, The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast, *Breast Cancer Res Treat*. 59 (2000) 1-14.
- 236.- M.J. Szczepanski, A.B. Deleo, M. Luczak, M. Molinska-Glura, J. Misiak, B. Szarzynska, G. Dworacki, M. Zagor, N. Rozwadowska, M. Kurpisz, A. Krezski, A. Kruk-Zagajewska, T. Kopec, J. Banaszewski, T.L. Whiteside, PRAME expression in head and neck cancer correlates with markers of poor prognosis and might help in selecting candidates for retinoid chemoprevention in pre-malignant lesions, *Oral Oncol*. 49 (2012) 144-151.
- 237.- A.J. Español, M.N. Sales, Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines, *Int J Mol Med*. 13 (2004) 311-317.
- 238.- G.L. Fiszman, M.C. Middonno, E. de la Torre, M. Farina, A.J. Español, M.E. Sales, Activation of muscarinic cholinergic receptors induces MCF-7 cells proliferation and angiogenesis by stimulating nitric oxide synthase activity, *Cancer Biol Ther*. 6 (2007) 1106-1113.
- 239.- A.J. Español, E. de la Torre, G.L. Fiszman, M.E. Sales, Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression, *Life Sci*. 80 (2007) 2281-2285.
- 240.- M. Ferretti, C. Fabbiano, M. Di Bari, D. Ponti, A. Calogero, A.M. Tata, M2 muscarinic receptors inhibit cell proliferation in human glioblastoma cell lines, *Life Sci*. 91 (2012) 1134-1137.
- 241.- H. Cabadak, B. Aydin, B. Kan, Regulation of M2, M3, and M4 muscarinic receptor expression in K562 chronic myelogenous leukemic cells by carbachol, *J Recept Signal Transduct Res*. 31 (2011) 26-32.
- 242.- J. Keenan, H. Joyce, S. Aheme, S. O'Dea, P. Doolan, V. Lynch, M. Clynes, Olfactomedin III expression contributes to anoikis-resistance in clonal variants of a human lung squamous carcinoma cell line, *Exp Cell Res*. 318 (2012) 593-602.
- 243.- M. Miljkovic-Licina, P. Hammel, S. Garrido-Urbani, B.P. Lee, M. Meguenani, C. Chaabane, M.L. Bochaton-Piallat, B.A. Imhof, Targeting Olfactomedin-like 3 inhibits tumor growth by impairing angiogenesis and pericyte coverage, *Mol Cancer Ther*. 11 (2012) 2588-2599.
- 244.- V. Rouget-Quemalet, J. Giustiniani, A. Marie-Cardine, G. Beaud, F. Besnard, D. Loyaux, P. Ferrara, K. Leroy, N. Shimizu, P. Gaulard, A. Bensussan, C. Schmitt, Protocadherin 15 (PCDH15): a new secreted isoform and a potential marker for NK/T cell lymphomas, *Oncogen*. 25 (2006) 2807-2811.
- 245.- K. Adachi, M. Toyota, Y. Sasaki, T. Yamashita, S. Ishida, M. Ohe-Toyota, R. Maruyama, Y. Hinoda, T. Saito, K. Imai, R. Kudo, T. Tokino, Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene, *Oncogene*. 23 (2004) 7791-7798.
- 246.- R.G. Rodrigues, A. Panizo-Santos, J.A. Cashel, H.C. Krutzsch, M.J. Merino, D.D. Roberts, Semenogelins are ectopically expressed in small cell lung carcinoma, *Clin Cancer Res*. 7 (2001) 854-860.
- 247.- Y. Zhang, Z. Wang, J. Zhang, B. Farmer, S.H. Lim, Semenogelin I expression in mieloma cells can be upregulated pharmacologically, *Leuk Res*. 32 (2008) 1889-1894.

- 248.- T. Hienonen, H. Sammalkorpi, S. Enholm, P. Alhopuro, T.D. Barber, R. Lehtonen, N.N. Nupponen, H. Lehtonen, R. Salovaara, J.P. Mecklin, H. Jarvinen, R. Koistinen, D. Arango, V. Launonen, B. Vogelstein, A. Karhu, L.A. Aaltonen, Mutations in two short noncoding mononucleotide repeats in most microsatellite-unstable colorectal cancers, *Cancer Res.* 65 (2005) 4607-4613.
- 249.- A. Mitra, R.T. Richardson, M.G. O'Rand, Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility, *Biol Reprod.* 82 (2010) 489-496.
- 250.- A.M. Canacci, K. Izumi, Y. Zheng, J. Gordetsky, J.L. Yao, J.L., H. Miyamoto, Expression of semenogelins I and II and its prognostic significance in human prostate cancer, *Prostate.* 71 (2011) 1108-1114.
- 251.- S. Santagata, C.L. Maire, A. Idbaih, L. Geffers, M. Corell, K. Holton, J. Quackenbush, K.L. Ligon, CRX is a diagnostic marker of retinal and pineal lineage tumors, *PLoS ONE.* 4 (2009) e7932.
- 252.- D.D. Glubrecht, J.H. Kim, L. Russell, J.S. Bamforth, R. Godbout, Differential CRX and OTX2 expression in human retina and retinoblastoma, *J Neurochem.* 111 (2009) 250-263.
- 253.- J. Terry, M.L. Calicchio, C. Rodriguez-Galindo, A.R. Perez-Atayde, Immunohistochemical expression of CRX in extracranial malignant small round cell tumors, *Am J Surg Pathol.* 36 (2012) 1165-1169.
- 254.- G.M. Yousef, A. Scorilas, K. Jung, L.K. Ashworth, E.P. Diamandis, Molecular cloning of the human Kallikrein 15 gene (KLK 15), *J Biol Chem.* 276 (2001) 53-61.
- 255.- G.M. Yousef, A. Scorilas, D. Katsaros, S. Fracchioli, L. Iskander, C. Borgono, I.A. Rigault de la Longrais, M. Puopolo, M. Massobrio, E.P. Diamandis, Prognostic value of the human Kallikrein gene 15 expression in ovarian cancer, *J Clin Oncol.* 21 (2003) 3119-3126.
- 256.- A. Rabien, F.R. Fritzsche, M. Jung, A. Tolle, E.P. Diamandis, K. Miller, K. Jung, G. Kristiansen, C. Stephan, KLK15 is a prognostic marker for progression-free survival in patients with radical prostatectomy, *Int J Cancer.* 127 (2010) 2386-2394.
- 257.- G.M. Yousef, A. Scorilas, A. Magklara, N. Memari, R. Ponzzone, P. Sismondi, N. Biglia, M. Abd Ellatif, E.P. Diamandis, The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer, *Br J Cancer.* 87 (2002) 1294-300.
- 258.- Y. Kudo, I. Ogawa, S. Kitajima, M. Kitagawa, H. Kawai, P.M. Gaffney, M. Miyauchi, M., T. Takata, Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 6928-6935.
- 259.- I. Malanchi, A. Santamaria-Martínez, E. Susanto, H. Peng, H.A. Lehr, J.F. Delaloye, J. Huelsken, Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization, *Nature.* 481 (2011) 85-89
- 260.- A. Kanno, K. Satoh, A. Masamune, M. Hirota, K. Kimura, J. Umino, S. Hamada, A. Satoh, S. Egawa, F. Motoi, M. Unno, T. Shimosegawa, Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells, *Int J Cancer.* 22 (2008) 2707-2718.
- 261.- M. Kyutoku, Y. Taniyama, N. Katsuragi, H. Shimizu, Y. Kunugiza, K. Iekushi, N. Koibuchi, F. Sanada, Y. Oshita, R. Morishita, Role of periostin in cancer progression and metastasis:



- Inhibition of breast progression and metastasis by anti-periostin antibody in a murine model, *Int J Mol Med*. 28 (2011) 181-186.
- 262.- H. Carter, J. Samayoa, R.H. Hruban, R. Karchin, Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM), *Cancer Biol Therapy*. 10 (2010) 582-587.
- 263.- Q. Li, L. Wang, W. Tan, Z. Peng, Y. Luo, Y. Zhang, G. Zhang, D. Na, P. Jin, T. Shi, D. Ma, L. Wang, Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF- $\kappa$ B pathways and promotes cell survival in human cancer cells, *Cancer Lett*. 28 (2011) 203-214.
- 264.- M. Belirgen, S.G. Berrak, H. Ozdag, S.U. Bozkurt, E. Eksioglu-Demiralp, M.M. Ozek, Biologic tumor behavior in pilocytic astrocytomas, *Childs Nerv Syst*. 28 (2012) 375-389.
- 265.- Y.W. Huang, R.A. Jansen, E. Fabbri, D. Potter, S. Liyanarachchi, M.W. Chan, J.C. Liu, A.P. Crijns, R. Brown, K.P. Nephew, A.G. van der Zee, D.E. Cohn, P.S. Yan, T.H. Huang, H.J. Lin, Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection, *Oncol Rep*. 22 (2009) 853-861.
- 266.- G. Heller, V.N. Babinsky, B. Ziegler, M. Weinzierl, C. Noll, C. Altenberger, L. Müllauer, G. Dekan, Y. Grin, G. Lang, A. End-Pfützenreuter, I. Steiner, S. Zehetmayer, B. Döme, B.M. Ams, K.M. Fong, C.M. Wright, I.A. Yang, W. Klepetko, M. Posch, C.C. Zielinski, S. Zöchbauer-Müller, Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients, *Carcinogenesis*. (2012) Dec 7 [Epub ahead of print].
- 267.- T. Wirth, E. Soeth, F.Czubayko, H. Juhl, Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of colon cancer cells and inhibits metastatic tumor growth, *Clin Exp Metastasis*. 19 (2002) 155-160.
- 268.- O. Arrieta, D. Saavedra-Perez, R. Kuri, A. Aviles-Salas, L. Martínez, D. Mendoza-Posada, P. Castillo, A. Astorga, E. Guzman, J. De la Garza, Brain metastasis development and poor survival associated with carcinoembryonic antigen (CEA) level in advanced non-small cell lung cancer: a prospective analysis, *BMC Cancer*. 9 (2009) 119.
- 269.- S. Liebhardt, N. Ditsch, R. Nieuwland, A. Rank, U. Jeschke, F. Von Koch, K. Friese, B. Toth, CEA-, Her2/neu-, BCRP- and Hsp27- positive microparticles in breast cancer patients, *Anticancer Res*. 30 (2010) 1707-1712
- 270.- Chong CE, Lim KP, Gan CP, Marsh CA, Zain RB, Abraham MT, Prime SS, Teo SH, Silvio Gutkind J, Patel V, Cheong SC. Over-expression of MAGED4B increases cell migration and growth in oral squamous cell carcinoma and is associated with poor disease outcome. *Cancer Lett*. 2012 Aug 1;321(1):18-26.
- 271.- Petit V, Thiery JP. Focal adhesions: structure and dynamics. 2010. *Biology of the Cell*. 92 (2000) 477-494
- 272.- Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. 2001. *Journal of Cell Science*. 114, 3583-3590
- 273.- Lianne M, Warabi K, Andersen RJ, Roskelley CD, Roberge M. Strongylophorine-26, a Rho-dependent inhibitor of tumor cell invasion that reduces actin stress fibers and induces nonpolarized lamellipodial extensions. 2005. *Mol Cancer Ther* 2005;4:772-778.
- 274.- Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. 2004. *Curr Opin Cell Biol*. 16: 94-98.

- 275.- Priddle H, Hemmings L, Monkley S, Woods A, Patel B, Sutton D, Dunn GA, Zcha D, Critchley DR. Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. 1998. *J Cell Biol.* 142: 1121–1133.
- 276.- Calderwood DA, Ginsberg MH. Talin forges the links between integrins and actin. 2003. *Nat Cell Biol.* 5: 694–697.
- 277.- Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. 2004. *Nat Cell Biol* 6: 977–983.
- 278.- Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. 1997. *J Biol Chem.* 272(52):32719-32722
- 279.- Wu Z, Li X, Sunkara M, Spearman H, Morris AJ, Huang C. PIPK1 $\gamma$  regulates focal adhesion dynamics and colon cancer cell invasion. 2011. *PLoS One.* 6(9):e24775. doi: 10.1371/journal.pone.0024775
- 280.- Xu Y, Bismar TA, Su J, Xu B, Kristiansen G, Varga Z, Teng L, Ingber DE, Mammoto A, Kumar R, Alaoui-Jamali MA. Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *J Exp Med.* 2010. 207: 2421–2437.
- 281.- Xie, H., Pallero, M.A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M.F., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Lauffenburger, D.A., Murphy-Ullrich, J.E., Wells, A., EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility associated PLC gamma signalling pathway. 1998. *J. Cell Sci.* 111, 615–624.
- 282.- Le PU, Angers-Loustau A; de Oliveira RMW, Ajlan A, Brassard CL, Dudley A, Brent H, Siu V, Trinh G, Mölenkamp G, Wang, Seyed M; Bedell B, Del Maestro RF, Petrecca K. DRR drives brain cancer invasion by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics. *Oncogene.* 2010. 29: 4636–4647.
- 283.- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T.. Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. 2005. *Molecular Cancer* 4:37 doi:10.1186/1476-4598-4-37
- 284.- Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell Invasion and migration. 2002. *Nature Reviews.* (2):91-100. DOI: 10.1038/nrc727
- 285.- Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M. 2012. Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. 2012. *International Journal of Cell Biology.* Volume 2012, Article ID 310616, 10 pages doi:10.1155/2012/310616
- 286.- Takino T, Watanabe Y, Matsui M, Miyamori H, Kudo T, Seiki M, Sato H. 2006. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res.* 312(8):1381-1389.
- 287.- Lim Y, Han I, Jeon J, Park H, Bahk YY, Oh ES. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. (2004). *J. Biol. Chem.* 279: 29060–29065.
- 288.- Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller, MD, Jacobson K. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. 2003. *Nature* 424:219–223.

- 289.- Liu KC, Huang AC, Wu PP, Lin HY, Chueh FS, Yang JS, Lu CC, Chiang JH, Meng M, Chung JG. Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. *Oncol Rep.* 2011 26(1):177-84. doi: 10.3892/or.2011.1264.
- 290.- Zhang YH, Wang SQ, Sun CR, Wang M, Wang B, Tang JW. Inhibition of JNK1 expression decreases migration and invasion of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Med Oncol.* 2011. 28(4):966-72. doi: 10.1007/s12032-010-9568-2.
- 291.- Ono R, Matsuoka J, Yamatsuji T, Naomoto Y, Tanaka N, Matsui H, Matsushita M. M-RIP, a novel target of JNK signaling and a requirement for human cancer cell invasion. *Int J Mol Med.* 2008 Aug;22(2):199-203.
- 292.- Johnson S.M. et al. (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family". *Cell* 120 (5): 635–647
- 293.- Lisa B. Frankel, Nanna R. Christoffersen. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an important Functional Target of the miR-21. *J. Biol Chem* 2008. 283:1026-1033.
- 294.- Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg.* 2007 Jan;94(1):23-30.
- 295.- Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, Wiemann S, Sahin O. Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J Pathol.* 2010 Jan;220(1):71-86. doi: 10.1002/path.2610.
- 296.- Xu Y, Shi QL, Ma H, Zhou H, Lu Z, Yu B, Zhou X, Eriksson S, He E, Skog S. High thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2012;33(2):475–483. doi: 10.1007/s13277-011-0276-0. [PubMed] [Cross Ref]
- 297.- He E, Xu XH, Guan H, Chen Y, Chen ZH, Pan ZL, Tang LL, Hu GZ, Li Y, Zhang M. et al. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast, lung, and esophageal cancer and non-Hodgkin's lymphoma. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2010;29(4–6):352–358. [PubMed]
- 298.- Aaron L Sarver,#1 Venugopal Thayanithy,#2 Milcah C Scott,#3 Anne-Marie Cleton-Jansen,#4 Pancras CW Hogendoorn,#4 Jaime F Modiano,1,3 and Subbaya Subramaniancorresponding author1,2 MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8: 7.
- 299.- Crum CP, McKeon FD (2010). "p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia". *Annu Rev Pathol* 5: 349–71. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102117. PMID 20078223.
- 300.- Deutsch GB, Zelonka EM, Coutandin D, Weber TA, Schäfer B, Hannewald J, Luh LM, Durst FG, Ibrahim M, Hoffmann J, Niesen FH, Sentürk A, Kunkel H, Brutschy B, Schleiff E, Knapp S, Acker-Palmer A, Grez M, McKeon F, Dötsch V (February 2011). "DNA damage in oocytes induces a switch of the quality control factor TAp63α from dimer to tetramer". *Cell* 144 (4): 566–76. doi:10.1016/j.cell.2011.01.013. PMC 3087504. PMID 21335238.

- 301.- Shiran MS, Tan GC, Sabariah AR, Rampal L, Phang KS (March 2007). "p63 as a complementary basal cell specific marker to high molecular weight-cytokeratin in distinguishing prostatic carcinoma from benign prostatic lesions". *Med. J. Malaysia* 62 (1): 36–9. PMID 17682568.
- 302.- Witten D, Tibshirani R, Guoping S, Fire A, Weng-Onn L. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC Biology* 2010, 8:58 doi:10.1186/1741-7007-8-58
- 303.- Nordentoft I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbæk M, Theodorescu D, Ostensfeld MS, Hartmann A, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjøt L. miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. *BMC Med Genomics*. 2012 Sep 6;5:40. doi: 10.1186/1755-8794-5-40.
- 304.- Christensen LL, Tobiasen H, Holm A, Schepeler T, Ostensfeld MS, Thorsen K, Rasmussen MH, Birkenkamp-Demtroeder K, Sieber OM, Gibbs P, Lubinski J, Lamy P; COLOFOL steering group, Laurberg S, Oster B, Hansen KQ, Hagemann-Madsen R, Byskov K, Ørntoft TF, Andersen CL. MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2013 Jul;133(1):67-78. doi: 10.1002/ijc.28010. Epub 2013 Feb 12.
- 305.- Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg*. 2009 Apr;33(4):698-709. doi: 10.1007/s00268-008-9833-0.
- 306.- Nordentoft I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbæk M, Theodorescu D, Ostensfeld MS, Hartmann A, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjøt L. miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. *BMC Med Genomics*. 2012 Sep 6;5:40. doi: 10.1186/1755-8794-5-40.
- 307.- Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007 Dec. 14;131(6):1109-1123.
- 308.- Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans*. 2004 Jun;32(Pt3):416-20.
- 309.- Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3583-90.
- 310.- Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol*. 2007 Dec;213(3):565-73.
- 311.- Rivelino D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*. 2001 Jun 11;153(6):1175-86.
- 312.- Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):32719-22.

313.- McHardy LM, Warabi K, Andersen RJ, Roskelley CD, Roberge M. Strongylophorine-26, a Rho-dependent inhibitor of tumor cell invasion that reduces actin stress fibers and induces nonpolarized lamellipodial extensions. *Mol Cancer Ther.* 2005 May;4(5):772-8.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 25 de Febrero del 2014, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Miguel Ángel Fonseca Sánchez

Dr. César López Camarillo

---

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

---

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

---

Dra. Laurence A. Marchat Marchau

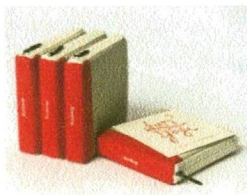
---

Dra. Elena Arechaga Ocampo

---



Pedro Ahumada



**TESIS URGENTES**

**REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A  
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.**

**Tel. 55-12-84-69**

**Part. 26-19-07-42**

**PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.  
SÁBADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.**

**[impresosahumada@hotmail.com](mailto:impresosahumada@hotmail.com)**