

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Análisis funcional del microRNA-204 en cáncer de mama

TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

JOSÉ ALI FLORES PÉREZ

Director de tesis

Dr. Mario César López Camarillo

Ciudad de México, a Diciembre de 2016

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

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

ASESORES

Dra. Elena Arechaga Ocampo.
Profesora investigadora.
Departamento de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Elisa Azuara Liceaga.
Profesora Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Itzel López Rosas
Profesora Catédras CONACYT
Colegio de Postgraduados
Campus Campeche

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

LECTORES DE TESIS

Dra. Elena Arechaga Ocampo.

Investigadora.

Departamento de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Rosa Martha E. Yocupicio Monroy

Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Itzel López Rosas

Profesora Catédras CONACYT

Colegio de Postgraduados

Campus Campeche

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo 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, a quien agradezco permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como todo el apoyo y las enseñanzas brindadas.

De igual manera quiero agradecer a la Dra Elena Arechaga Ocampo por el apoyo académico, moral y en especie brindados incondicionalmente para el desarrollo de este trabajo y a su indudable calidad humana, a la Dra Mavil Lopez Casamichana por su asesoría para llevar a buen término este proyecto a la, Dra.Elisa Azuara Liceaga por las observaciones realizadas para mejorar y llevar a buen término este proyecto, a la Dra. Itzel López Rosas maestra y amiga que me ayudo a desarrollarme como investigador.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por el apoyo académico y económico (becas nuevas para Obtención de grado 2016-II) así como al Colegio del Posgrado de Ciencias Genómicas por su apoyo al desarrollo de este trabajo.

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología CONACyT por el financiamiento de este proyecto de investigación a través del programa CONACyT - fondo investigación científica básica and SS/IMSS/ISSSTE así como por la beca brindada (222335) de igual manera quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ICyTDF) por el apoyo económico concedido mediante la beca otorgada en el periodo que va de septiembre del 2011 a Mayo del 2014 (ICyTDF-UACM, SRI/PB/64/2011). Agradezco al consejo Mexiquense de ciencia y tecnología (COMECyT) por la beca para realización de tesis (No. 14BTD0106) otorgada en julio de 2014.

También quiero agradecer al súper grupo de trabajo del laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer, Olga, Raul, Carlos, Raquel, Zayra, Ana, Yadira, Gilberto, Diana, Lidia, Anabel porque hacen el trabajo fácil y divertido y me hacen amar estar en el laboratorio.

Agradezco a mis amigos Rubi (Bichita), Miguel del Moral, Miguel Fonseca, Israel (Enano), los malos team, Thommy, Andy, Gustavo (Sr. Pez), Marcos (Cuervo), porque su amistad siempre fue un pilar que me mantuvo luchando, avanzando y sobre todo cuerdo.

A mi mejor amiga Alma María a quien respeto y admiro, por ser siempre ese apoyo incondicional para mí, por sus palabras y jalones de oreja.

DEDICATORIAS:

A mis padres por darme la vida y apoyarme en todos los proyectos que me he propuesto y enseñarme a nunca rendirme ante nada y que nada en esta vida es imposible.

A mis hermanos Tavo, Bety por creer en mí y darle ese sabor divertido a mi vida.

A Nícte-Ha por estar conmigo siempre, incluso aun cuando ya no esta presente, por que fuiste mi inspiración y el motivo de continuar, crecer y superarme cada día. Porque siempre fuiste mi razón para sonreír.

INDICE	Página
Abreviaturas	XII
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Resumen	IXX
I.INTRODUCCION	1
1. Antecedentes generales del tema	1
1.1. El Cáncer	1
1.2 Carcinogénesis	4
1.2.1. Inicio tumoral	7
1.2.2. Promoción tumoral	8
1.2.3. Conversión maligna y progresión tumoral	9
1.3. Los “Halmarks” del cáncer	11
1.3.1. Autosuficiencia de las señales de crecimiento	12
1.3.2. Insensibilidad a las señales anti-crecimiento	14
1.3.3. Evasión a los procesos de muerte celular programada	16
1.3.4. Ilimitado potencial Replicativo	18
1.3.5. Angiogénesis	20
1.3.6. Metástasis	21
1.3.7. Inestabilidad genómica	23
1.3.8. Inflamación tumoral	23
1.3.9. Desregulación metabólica y energética	24
1.3.10. Evasión a la destrucción por el sistema inmune	26
1.4. El cáncer a nivel mundial	27
1.5. El cáncer de mama	29
1.5.1. Factores de riesgo en cáncer de mama	31
1.5.2. Clasificación del cáncer de mama	32
1.5.3. Tratamiento del cáncer de mama	36
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	38
2.1. Los miRNAs	38

2.1.2. microRNAs en el cáncer de mama	39
2.1.3. Biogénesis de los miRNAs	41
3. ESTADO DEL ARTE	45
3.1. El microRNA-204 y el cáncer	45
3.2. El miRNA-204 y la angiogénesis	48
4. Importancia de continuar el estudio del tema	51
II. OBJETIVOS	53
1. Objetivo general	53
2. Objetivos particulares	53
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	54
IV. MATERIAL Y METODOS	55
1. Obtención de biopsias de tejido tumoral y tejido mamario normal	55
2. Estratificación de las muestras	56
3. Extracción de RNA total de biopsias tumorales y normales	57
4. Cuantificación del RNA	58
5. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama	59
5.1. Condiciones de cultivo de las líneas celulares	59
5.2. Subcultivo de líneas celulares	59
5.3. Congelamiento de líneas celulares	60
6. Lisis y extracción de RNA total a partir de líneas celulares	61
6.1. Análisis de integridad del RNA	62
7. Análisis de la expresión del miR-204 mediante sondas taqMan	62
8. Transfección del precursor del miR-204	63
9. Hibridación de microarreglos de expresión génica	64
9.1. Síntesis de cDNA a partir de RNA total de células Transfectadas	65
9.2. Marcaje de cDNA	66
9.3 Hibridación de microarreglos Nimblegen 12x135k	68

9.4. Escaneo y análisis de microarreglos	69
10. Validación de los microarreglos de expresión	69
11. Evaluación de la viabilidad celular por ensayos MTT	72
12. Evaluación de proliferación celular por MTT	73
13. Evaluación de la proliferación celular mediante	73
Ensayo clonogénico <i>in vitro</i>	
14. Determinacion de la migración celular mediante ensayo de “cicatrización de herida” (Wound-Healing	74
15. Ensayo de invasión celular en cámaras transwell	75
16. Determinación de la expresión de las proteínas	76
ANGPT1, CREB5 y TGFBR2 en líneas de CM y biopsias de tejido normal y tumoral	
16.1 Obtención de extractos proteicos totales	76
16.2 Determinacion de la concentración de proteínas	77
16.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	78
16.5 Ensayos de inmunodeteccion	79
17. Análisis bioinformaticos	81
18. Construcciones plásmidos pmiR-LUC-3'UTR.	82
18.1. Amplificacion de las secuencias 3'UTR de los genes <i>creb5</i> , <i>mapres2</i> , <i>angpt1</i> , <i>tgfbr2</i> y <i>sma4</i>	82
18.2. Hibridación y clonación de las secuencias 3'UTR mutadas	83
18.3. Ligación de los insertos 3'UTR dentro del plásmido pmiR-report-Luc	84
19. validación de blancos mediante construcciones LUC-3'UTR	89
19.1. Tranfeccion de las contrucciones pmiR-LUC-ANGPT1 pmiR-LUC-TGFβR2, pmiR-LUC-CREB.1, pmiR-ANGPT1.MUT y pmiR-TGFBR1-MUT en células MDA-MB-231	89
19.2. Co-tranfeccion del pre-miR204 y pre-miR-Neg-Ctrl	90

en células transfectadas con las construcciones	
pmiR-LUC-3' UTR	
19.3. Detección de la actividad luciferasa	91
20. ensayos de angiogénesis	91
20.1 Ensayo de formación de túbulos <i>in vitro</i>	91
20.2 Ensayo directo de angiogénesis <i>in vivo</i> (DIVAA)	92
21. Silenciamiento de los genes <i>angpt1</i> y <i>tgfbr2</i>	95
21.1. Silenciamiento de la expresión de los genes <i>angpt1</i>	95
Y <i>tgfbr2</i> mediante interferencia del RNA	
21.2. Elección e hibridación de las secuencias blanco	95
21.3. Ligación de los insertos siRNA dentro de pSilencer	96
21.4. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5α	96
21.5. Extracción de plásmido por lisis alcalina	97
21.6 Silenciamiento de los genes <i>angpt1</i> y <i>tgfbr2</i> en la línea	100
celular MDA-MB-231	
22. Ensayo de rescate de la expresión de los genes	101
<i>angpt1</i> y <i>tgfbr2</i>	
V.RESULTADOS	106
1.0 Evaluación de la expresión del miR-204 en biopsias de	106
Tejido mamario tumoral y tejido mamario normal	
2.0 Análisis de la expresión del miR-204 en líneas celulares	115
de cáncer de mama	
3. Identificación de los mRNAs blanco del miR-204.	117
3.1 sobreexpresión del miR-204 en la línea celular de	117

cáncer de mama MDA-MB-231	
3.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión del miR-204	119
Sobre la viabilidad celular	
3.3. Análisis de la expresión de mRNAs modulados por el	120
miR-204 en células MDA-MB-231 mediante microarreglos	
3.4. Búsqueda de las posibles rutas y procesos modulados	133
por el miR-204	
3.5. Predicción de los mRNAs blanco del miR-204	135
4. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la	140
regulación de la proliferación en las líneas celulares de	
cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7	
5. Análisis del efecto del miR-204 sobre la apoptosis	143
6. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre los	143
procesos celulares migración e invasión en líneas	
Celulares de cáncer de mama	
7. El miR-204 como modulador de la angiogénesis	148
8. Validación de genes blanco del miR-204 mediante ensayos	153
de detección de actividad luciferasa	
9. Silenciamiento de los genes angpt1 y tgfr2 y su efecto	161
Sobre angiogénesis	
VI. DISCUSION	166
VII.CONCLUSIONES	172
VIII. ARTICULOS PUBLICADOS	173
IX. REFERENCIAS	181
X. ANEXOS	192

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DNAc	Ácido desoxirribonucleíco complementario
RNA	Ácido ribonucleíco
RNA _m	ARN mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CM	Cáncer de mama
CO ₂	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxilo terminal
D.O.	Densidad óptica
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP's	Desoxi nucleótidos trifosfatados
DL50	Dosis letal 50
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ET	Extracto total
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
GFP	Proteína verde fluorescente
h/hrs	Hora/ horas
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano picante

kDa	Kilodaltones
kpb	kilopares de bases
l	Litros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertoni
mA	Miliamperios
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
miRNA	microRNA
ml	Mililitros
AcMo	Anticuerpo monoclonal
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-. 2,5 difenil bromuro de tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	Nucleótidos
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grado centígrado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PISt	Penicilina-estreptomicina
poAc	Anticuerpo policlonal
PSA	Persulfato de amonio
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RbCl	Cloruro de rubidio
RNAi I	nterferencia del ARN
rpm	Revoluciones por minuto

RT	Transcripción reversa
s	Segundo
s/d	Sin digerir
SDS	Dodecil sulfato de amonio
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	Short hairpin RNA
TA	Temperatura ambiente
Ta	Temperatura de alineamiento
TMN	Tejido mamario normal
TBE	Tampón de Tris, borato y EDTA
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	Microlitros
UV	Ultravioleta
U	Unidades
Wb	Western blot

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
Figura 1. Los 4 principales tipos de cáncer	5
Figura 2. El proceso de carcinogénesis	10
Figura 3. Hallmarks en cáncer.	25
Figura 4. Principales tipos de cáncer a nivel mundial. en hombres y mujeres.	28
Figura 5. Clasificación del cáncer de mama	34
Figura 6. Localización genómica de los miRNAs.	42
Figura 7. Representación esquemática de la biogénesis y de los miRNAs de mamíferos.	44
Figura 8. Plasmido pmiR-repor.	88
Figura 9. Ensayo de angiogénesis in vivo	94
Figura 10. Mapa del vector plasmidico p-Silencer U6 Retro.	98
Figura 11. Mapa del vector de expresión pCDNA3.	103
Figura 12. Expresión del miR-204 en TNM y TT.	109
Figura 13. Análisis de la expresión del miR-204 en datos del TCGA	110
Figura 14. Expresión del miR-204 en biopsias tumorales	112
Figura 15. Análisis de la expresión del miR-204 en biopsias te tejido mamario tumoral con base en el subtipo clínico.	113
Figura 16. Análisis de la expresión del miR-204 en biopsias	114

de tejido mamario tumoral con base en la expresión de los receptores

Figura 17. Expresión del miR-204 en líneas celulares de 116
cáncer de mama.

Figura 18. Sobreexpresión ectópica del miR-204 en la línea celular 118
MDA-MB-231 mediante la transfección de precursores.

Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la 122
viabilidad celular

Figura 20. Validación de microarreglo de expresión mediante RT-PCR 132
en tiempo real

Figura 21. Análisis de enriquecimiento de los genes regulados 134
por el miR-204 en la línea celular MDA-MB-231

Figura 22. El miR-204 disminuye la proliferación celular in vitro 142

Figura 23. El miR-204 no induce activación de apoptosis por sí mismo 146

Figura 24. El miR-204 disminuye la migración e invasión 147
en cáncer de mama in vitro.

Figura 25. El miR-204 inhibe angiogénesis in vitro 150

Figura 26. El miR-204 inhibe angiogenesis in vivo 152

Figura 27. Clonación de los fragmentos 3'UTR en el plasmido 156
pmiR-report

Figura 28. Validación de blancos del miR-204. 157

Figura 29. Silenciamiento de angpt1 y tgfb2 y su efecto sobre 164

la angiogénesis tumoral.

Figura 30. Efecto del rescate de la expresión de ANGPT1 y TGFBR2 165

sobre la inducción de la angiogénesis tumoral.

Figura 31. Modelo de la regulación de la proliferación, migración y 171

angiogénesis medidas por el miR-204 en cáncer de mama.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pagina
Tabla I .Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial y en México.	30
Tabla 2. Estadío clínico y características tumorales.	35
Tabla 3. blancos validados del miR-204.	47
Tabla 4. Validación del microarreglo de expresión mediante qRT-PCR	71
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodeteccion.	80
Tabla 6. Amplificación de fragmentos 3´UTR de los genes creb5, mapre 2, angpt1, tgfb2 y smad 4.	86
Tabla 7. Oligonucleótidos correspondientes a la 3´UTR de los genes angpt1 y tgfb2.	87
Tabla 8. Silenciamiento de a los genes angpt1 y tgfb1.	99
Tabla 9. Características clínicas de las biopsias de tejido mamario tumoral analizadas para determina la expresión del miR-204 mediante qRT-PCR	108
Tabla10. Genes modulados por el miR-204 en células MDA-MB-231 con una tasa de cambio <-1.5 y valor de P < 0.05	123
Tabla 11. Genes modulados por el miR204	138
Tabla 12 Amplificacion por PCR de las 3ÚTR de los genes CREB5, Mapre,ANGPT1,TGFBRII y SMAD4.	155

RESUMEN

Antecedentes: Recientemente los microRNAs han emergido como una nueva clase de reguladores negativos de la expresión génica. Estos pequeños RNAs no codificantes, funcionan a nivel potranscripcional modulando la expresión génica al promover la degradación o inhibición de la transcripción al unirse a la 3' UTR de sus genes blanco. De manera interesante la expresión aberrante de algunos microRNAs puede contribuir al desarrollo de diferentes neoplasias e incluso correlacionar con algunas características clínico-patológicas de estos tumores, por lo que los microRNAs pueden jugar un papel importante como nuevos biomarcadores pronósticos o incluso como blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

Resultados. Mediante el análisis del miRNoma de pacientes mexicanas con cáncer de mama, se lograron identificar 54 miRNAs desregulados (34 reprimidos y 20 sobreexpresados) de manera interesante, se observó que el miR-204 se encontraba reprimido de manera consistente en todas las biopsias analizadas, así mismo no existían reportes que ligaran a este RNA pequeño con el cáncer de mama. Para determinar el papel que juega el miR-204 en cáncer de mama se sobreexpresó de manera ectópica a este miRNA en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y se realizaron microarreglos de expresión para identificar a los genes modulados o los procesos celulares potencialmente afectados por este microRNA, los resultados obtenidos del análisis del transcriptoma mostraron 549 genes modulados de manera significativa, 238 fueron reprimidos y de estos 22 genes poseían al menos un sitio de unión para el miR-204, los juegan un papel importante en proliferación, migración, invasión celular y angiogénesis. Mediante la realización de ensayos funcionales se logró determinar que la sobreexpresión del miR-204 disminuye tanto proliferación como migración *in vitro* en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 por otro lado, mediante la realización de ensayos de angiogénesis a través de co-cultivos se demostró que el miR-204 inhibe angiogénesis *in vitro* adicionalmente se realizaron ensayos de angiogénesis *in vivo* donde se obtuvieron resultados similares. Finalmente se validaron mediante ensayo 3' UTR los genes ANGPT, TGFBR2 y CREB. Los cuales desempeñan un papel central en la regulación de angiogénesis, migración y proliferación celular en cáncer de mama. Con base en los resultados anteriormente descritos se propone que la manipulación a nivel molecular del miR-204 puede representar una herramienta de utilidad en el tratamiento del cáncer de mama.

ABSTRAC

Background: MicroRNAs (miRNAs) have emerged as a prominent class of negative regulators of gene expression. These non-coding small RNAs function in posttranscriptional gene silencing by complementing with the 3' UTR of target genes resulting in mRNA degradation or translational repression. Remarkably, aberrant expression of miRNAs may contribute to development of diverse neoplasia and correlates with clinical-pathological features of tumors thus representing useful prognostic markers and novel therapeutic targets in cancer.

Results: Studying the miRNome of breast tumors of Mexican patients, we identified 54 miRNAs (34 downregulated and 20 upregulated) in clinical specimens. Interestingly, we found a consistent repression of miR-204, a small-RNA with no previous involvement in angiogenesis in breast cancer. Gain-of-function analysis showed that restoration of miR-204 impairs cell proliferation, anchorage-independent cell growth, migration, invasion and angiogenesis. Moreover, formation of capillary tubular 3D structures indicative of vascular angiogenesis was also suppressed *in vivo*. Genomic-wide profiling of MDA-MB-231 cells expressing miR-204 revealed that 549 genes were significantly modulated. Of the 238 repressed genes a subset of 22 genes contained potential miR-204 binding sites. Of these, we demonstrated that pro-angiogenic ANGPT1 and TGF β R2 genes are novel effectors downstream of miR-204. Congruently, an inverse correlation between the miR-204 and ANGPT1 and TGF β R2 expression in breast tumors was found. Moreover, knockdown of TGFBR2, but not ANGPT1, abolish cell proliferation and migration, whereas inhibition of both genes inhibits angiogenesis. Our findings reveal a novel function of miR-204 in angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by targeting key pro-angiogenic genes. We propose that molecular manipulation of miR-204 levels may represent a promising approach in breast cancer therapy.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes generales del tema

1.1 El Cáncer

El cáncer es un término que se designa a un grupo de enfermedades etiológicamente distintas entre sí, que pueden afectar cualquier parte del cuerpo y tienen como características una alta tasa de replicación celular (células malignas), la capacidad de invadir tejidos adyacentes y propagarse a otros órganos. La diseminación de estas células malignas o anormales se realiza rápidamente y de una manera incontrolada lo que genera una masa conocida como tumor maligno. Una vez que se ha establecido el tumor en un órgano las células que conforman el tumor son capaces de migrar e invadir tejidos adyacentes incluso pueden llegar a torrente sanguíneo o sistema linfático y diseminarse e invadir otros órganos, este proceso es denominado metástasis [1]. Dada la capacidad de las células tumorales de invadir cualquier órgano se conocen más de 200 tipos de cáncer distintos los cuales son nombrados en función del órgano donde se origina; así mismo según el tipo de células involucradas y dependiendo del lugar donde se producen los distintos tipos de cáncer pueden clasificarse en:

Carcinomas

Son el tipo de cáncer más común ya que representan alrededor del 90% de los casos de cáncer, los cuales se originan en los epitelios que recubren el cuerpo y envuelven las diferentes glándulas así mismo algunas de las células que conforman un carcinoma pueden tener características diferentes, por lo que se les puede denominar:

- **Adenocarcinomas:** Cuando el cáncer se origina en el tejido glandular por ejemplo conductos lácteos, lóbulos de la mama o incluso en la próstata son denominados adenocarcinomas.
- **Carcinoma de células escamosas o epidermoide:** Se les nombra así aquellos tipos de cáncer que se originan en las células no glandulares que se encuentran en el tejido que forma el revestimiento de los órganos huecos del cuerpo y el revestimiento de los aparatos respiratorio y digestivo como pueden ser esófago, cuello uterino, vagina y cabeza y cuello.
- **Carcinoma de células basales:** Este es el tipo de cáncer más común en piel. Su origen se da en la capa de células basales la cual es la capa más profunda de la epidermis; esta clase de cáncer es más común encontrarlos en las zonas de la piel que se encuentran expuestas a la radiación solar, son un tipo de cáncer que raramente metastatizan a otras partes del cuerpo.
- **Melanoma:** Este tipo de cáncer tiene su origen en los melanocitos (células encargadas de producir melanina y dar la pigmentación en la piel) [2]

Sarcomas.

Esta variedad de cáncer es menos común que los carcinomas y son derivados de estructuras de soporte, como tejido fibroso y vasos sanguíneos, dependiendo del tipo de célula que los origina puede recibir diferentes nombres donde los tipos de sarcomas más comunes son:

- **Angiosarcoma:** Sarcoma que tiene su origen en los vasos sanguíneos.
- **Osteosarcoma:** Sarcoma derivado de células óseas.
- **Condrosarcoma:** Sarcoma derivado de células que conforman el tejido cartilaginoso.
- **Liposarcoma:** sarcoma que tiene su origen en el tejido adiposo.

Leucemias y linfomas

Son aquellos tipos de cáncer que se originan a partir de las células que se encuentran en sangre (principalmente leucocitos), medula ósea y en tejidos linfáticos, los pacientes con leucemia presentan un alto conteo de glóbulos blancos o leucocitos; las leucemias pueden clasificarse en función de tipo celular afectado como:

- **Leucemia mieloide:** La cual puede ser aguda, de evolución rápida (que se desarrolla rápidamente) donde se encuentra un alto número de mieloblastos (células inmaduras no linfoides) en medula ósea y en la sangre por otro lado la leucemia mieloide crónica es de evolución lenta donde se observa la presencia de un alto número de glóbulos blancos (no linfocitos) en medula ósea, también es llamada leucemia granulocítica crónica o leucemia mielogena crónica.
- **Leucemia linfoide:** Este tipo de leucemia se caracteriza por un alto conteo de linfoblastos B o T de igual manera que en las leucemia mieloide este tipo de cáncer puede ser de tipo agudo o crónico en donde esta último se ha observado que en estadios avanzados las

células cancerosas pueden además de estar en medula ósea y sangre, invadir en ganglios linfáticos.

- **Linfoma:** Cáncer que tiene su origen en el sistema linfático, existe 2 categorías básicas: linfoma de Hodgkin el cual tiene como característica principal la presencia de un tipo celular llamado células de Reed-Sternberg, las cuales son células gigantes malignas y que se originan a partir de linfocitos B, por otro lado los linfomas no Hodgkin pueden dividirse principalmente en linfoma con evolución indolente (de crecimiento lento) y de evolución dinámica (de crecimiento rápido) [3]

1.2. Carcinogénesis

La carcinogénesis es el proceso secuencial a través del cual una célula normal que posee un control riguroso de proliferación, ubicación territorial y expresión génica, se transforma en una célula tumoral que expresa en forma inadecuada genes que alteran su proliferación y su patrón expresión génica dándole la capacidad de invadir otros órganos así como evadir los mecanismos de muerte celular (Figura 2). Existen al menos 5 modelos propuestos para explicar el proceso de carcinogénesis estos son:

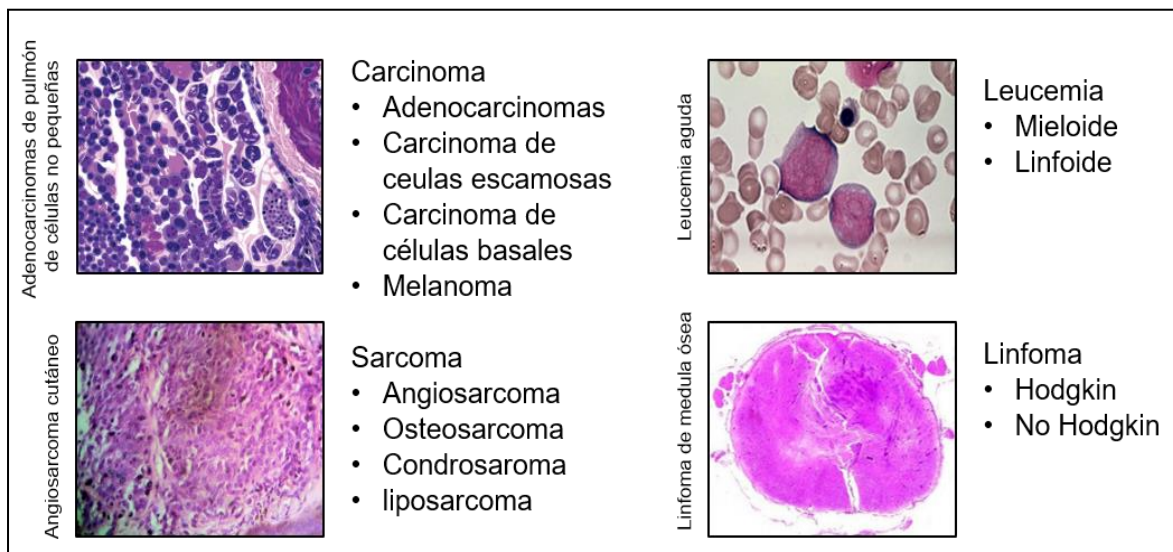


Figura 1. Los 4 principales tipos de cáncer. El cáncer puede clasificarse con base en el tipo de tejido donde se generan, principalmente en carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. (Imágenes tomadas de The human protein atlas, 2015)

- **Modelo “mutacional o multi-estados”:** Este es uno de los modelos más aceptados y conocidos el cual fue desarrollado por Armitage y Doll en 1954; este modelo está centrado principalmente en que las mutaciones generadas en el DNA pueden ser causadas por agentes químicos, ambientales, radiación o agentes virales que pueden iniciar y promover la generación de cáncer.
- **modelo de “inestabilidad genómica”:** Este modelo se centra principalmente en la carga genética heredada y la mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer entre un individuo que tuvo cáncer y su progeñe.
- **modelo “no-geno-tóxico”** Se enfoca en mecanismos no geno-tóxicos, expansión clonal y cambios epigenéticos como factores esenciales para el desarrollo del cáncer.
- **modelo “Darwiniano”** :Este modelo engloba algunos conceptos de los tres modelos anteriores basado en un concepto de “selección Darwiniana”
- **Modelo de organización de tejido:** Se centra en los cambios locales a nivel de micro ambiente y organización de tejido van a promover la formación y desarrollo de células pre-cancerosas, de este modelo hay 2 subtipos uno enfocado al microambiente y la segunda basada en los procesos de intercambio con el ambiente que tienden a preservar o mantener una forma, un estado, una organización dado en un sistema [4-5] (la teoría de morfostasis).

En general el proceso de carcinogénesis puede ser dividido principalmente en 3 etapas: inicio tumoral, promoción tumoral, conversión maligna y progresión tumoral.

1.2.1. Inicio tumoral

El concepto de inicio tumoral indica que los cambios tempranos en la carcinogénesis son generados por daño genético irreversible (mutaciones) causados por carcinógenos químicos o virales dichos carcinógenos pueden ser adquiridos por la dieta, el estilo de vida e incluso en el ambiente. La OMS estima que aproximadamente entre el 10 y el 19% de los casos de cáncer son atribuidos a la exposición ambiental de carcinógenos. Adicionalmente estudios recientes en células pre-neoplásicas humanas de tejido pulmonar y de colon indican que no solo las mutaciones son las responsables de la iniciación tumoral sino que también están implicados cambios a nivel epigenético, se ha observado que la metilación del DNA en regiones promotoras puede ocasionar silenciamiento transcripcional de la expresión de genes supresores de tumor [6]. Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica, se requiere la acumulación secuencial de varias mutaciones en distintos genes y eso ocurre a través de mucho tiempo, a veces de años de estar expuesto a un agente carcinogénico, estos son capaces de causar errores genéticos por la modificación de la estructura del DNA la unirse algún grupo funcional o algún nucleótido del DNA promoviendo la formación de aductos o mutaciones durante la etapa de síntesis de DNA en el ciclo de replicación celular [7] de hecho se ha observado

una correlación directa entre la formación de aductos DNA-carcinogeno con el tamaño y numero de tumores en distintos tejidos en modelos animales [8]

1.2.2. Promoción tumoral

La exposición a agentes carcinógenos puede causar alteraciones genéticas y epigenéticas principalmente en células susceptibles, generando cambios en algunos procesos por ejemplo incrementando su tasa de replicación y proliferación, dándoles una ventaja selectiva lo cual propiciará que se lleve a cabo una expansión clonal de células “mutadas” o células “iniciadas” las cuales son genómicamente inestables, esta condición puede promover su transformación en células neoplásicas. Se ha observado que en esta etapa hay una alta sobreexpresión de factores que promueven proliferación celular como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento derivado de hepatocitoma (HDGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y los factores de crecimiento transformante ($TGF-\beta$ y $TGF-\alpha$), entre otros. Los promotores tumorales por lo general son compuestos no mutagénicos necesariamente estos pueden ser elementos exógenos como algunos de los constituyentes del humo del cigarro o endógenos como ciertas hormonas y aunque estos no son carcinógenos por si mismo se ha observado que tienen actividad biológica, también pueden reducir el periodo de latencia para la formación tumoral después de que el tejido ha sido expuesto al compuesto iniciador y puede incrementar el número y tamaño de tumores que se forman en el tejido. Uno de los promotores más utilizados en investigación es el 12-O-

tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) el cual es un ester derivado del aceite de forbol. El TPA se utiliza usualmente en modelos animales de carcinogénesis en piel, usualmente ratones. Estos son tratados primero con un compuesto iniciador altamente mutagenico como pueden ser los hidrocarburos policíclicos aromaticos (PHA) [9]. Posteriormente el TPA promueve la proliferación celular de las células iniciadas a través de la activación de la protein-cinasa C (PKC), ciclina D1, EGF, y la sobreexpresión de citoquinas con actividad pro-proliferativa [10-12] generando la formación de un tumor de células pre-malignas.

1.2.3. Conversión maligna y progresión tumoral.

Finalmente una vez que se lleva a cabo la expansión clonal de las células iniciadas, se promueve la formación de tumores pre-neoplásicos, los cuales eventualmente debido a la acumulación de mutaciones, activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor inducen a las células pre-neoplásicas a proliferar dando lugar a tumores malignos así mismo cambios en las secuencias de DNA, mutaciones en genes importantes como por ejemplo mutaciones en el gen *p53*, *rb* o genes relacionados con procesos de reparación de daño a DNA [13] , han sido importantes en el proceso de malignidad tumoral, sin embargo aún no queda bien claro cuáles son los mecanismos, genes y rutas alteradas precisas, para el cambio de células normales a células tumorales.

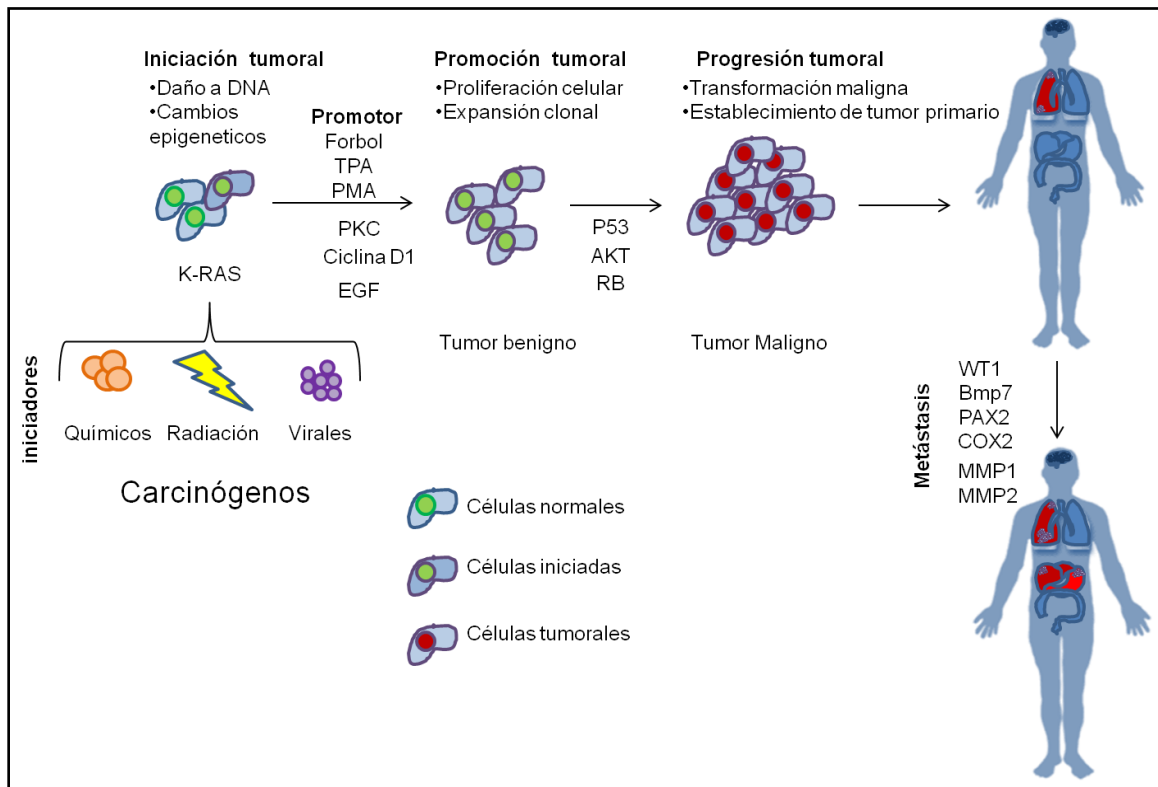


Figura 2. La carcinogénesis. El proceso de carcinogénesis puede dividirse principalmente en 3 etapas, inicio, promoción y progresión tumoral; donde en cada uno de los pasos suceden cambios importantes a nivel DNA, (mutaciones) RNA (cambios en la expresión) y a nivel epigenético (metilación del DNA y acetilación de histonas). Barcellos-Hoff M, *et al* Nature Reviews Cancer (2013)

Una vez que el tumor maligno se desarrolla, las células malignas son capaces, de perder sus características de adherencia, degradan matriz extra celular e invaden tejidos sanos adyacentes, hasta que logran llegar a torrente sanguíneo o a nódulos linfáticos por donde las células tumorales pueden ser transportadas a cualquier parte del cuerpo, establecerse, proliferar y generar un tumor secundario esto es a través de cambios en la expresión de genes que participan en la regulación de procesos como son la transición epitelial-mesenchimal (TEM) evasión del sistema inmune entre otros. En la figura 2 se esquematiza de manera general el proceso de carcinogénesis, así como algunos genes que juegan un papel importante en cada etapa del proceso de tumorigénesis.

1.3 Los “Hallmarks” del cáncer.

Existen diferencias en cuanto la expresión génica y comportamiento entre los diferentes tipos de cáncer, así mismo se sabe que el cáncer presenta una alta heterogeneidad incluso entre tumores del mismo tipo y órgano, sin embargo existe un grupo de procesos celulares que se encuentran alterados y son comunes en la mayoría o quizá en todos los tipos de cáncer. Estos procesos fueron denominados como los hallmarks del cáncer por Douglas Hanahan y Robert Weinberg en el año 2000 (Figura 3). Ellos sugirieron que en la amplia gama de fenotipos de células tumorales hay al menos 6 manifestaciones o alteraciones esenciales en la fisiología celular que determinan el crecimiento y desarrollo de las células malignas. los cuales son [14]: Autosuficiencia de las señales de crecimiento,

Insensibilidad a las señales de inhibición de crecimiento, Evasión a los procesos de muerte celular programada (apoptosis), Ilimitado potencial replicativo, Angiogénesis, Invasión a tejidos y metástasis. Adicionalmente en el 2011 Douglas Hanahan y Robert Weinberg anexaron 4 nuevos hallmarks del cáncer lo cual le da una nueva dimensión a esta enfermedad volviéndola aún más compleja así mismo se piensa que estos nuevos sellos del cancer son características que van a disponer o favorecer el desarrollo de todos los demás hallmarks estos son: inestabilidad genómica e inflamación tumoral, desregulación metabólica y evasión a la destrucción por el sistema inmune. [58]. (Figura 3)

1.3.1. Autosuficiencia de las señales de crecimiento

De manera normal las células responden a una serie de señales mitogenicas de crecimiento lo cual les permite pasar de un estado quiescente a un estado activo o proliferativo, este tipo de estímulos o señales son transmitidos a través de receptores transmembranales los cuales pueden unirse a un gran número de ligandos, como pueden ser factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, moléculas de interacción o unión con otras células, hormonas etc., por lo que a excepción de algunos tipos de células madre, al igual que algunos tejidos con alta tasa de regeneración, como el tejido hepático, la capacidad de proliferación celular es un proceso que se encuentra estrictamente regulado, así mismo se ha observado que la proliferación celular en organismos pluricelulares involucra una gran cantidad de puntos de control redundantes en el ciclo celular, así como mecanismos que activan automáticamente apoptosis o senescencia

cuando las células empiezan a proliferar. Estos sistemas reprimen aquellos procesos anormales para evitar que haya proliferación incontrolada, una débil regulación sobre la proliferación celular por lo tanto derivaría en un aumento incontrolado en la replicación celular. Existen distintos mecanismos mediante los cuales las células tumorales son capaces de adquirir autonomía de las señales de crecimiento; de manera normal la mayoría les los factores de crecimiento son producidos por un tipo de célula en particular, de tal manera que estimule la proliferación celular de otro tipo celular específico, sin embargo las células tumorales adquieren la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento, por lo que las mismas células tumorales pueden auto inducir su propia proliferación celular en un mecanismo de estimulación autocrino, uno de estos factores de crecimiento que se ha observado es producido por las células cancerosas es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) producido por células de glioblastoma, cáncer pancreático y meduloblastoma [15-17], de igual manera se ha observado que en células de sarcoma, astrocitoma, cáncer de pulmón y cáncer de colon se producen altas cantidades de factor de crecimiento transformante α (TGF α) [18-21] por otra parte todos los factores de crecimiento necesitan unirse a receptores transmembranales específicos, los cuales son los encargados de transducir la señal para estimular proliferación celular, estos al igual que los factores de crecimiento y proliferación celular se encuentran sobreexpresados en los distintos tipos de células tumorales, algunos ejemplos de esto es la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR/erbB) se observa en el cáncer de cabeza y cuello así como en cáncer de

pulmón [22-24]. Otro ejemplo es el caso del receptor HER2/neu que se encuentra sobreexpresado principalmente en cáncer de estómago y mama [25-30], por otra parte la sobreexpresión de estos receptores pueden promover proliferación celular de forma ligando-independiente, esto se ha observado en el caso del receptor de EGF el cual presenta alteraciones estructurales en su dominio citoplasmático, la presencia de estas mutaciones (c.2369C>T, T790M) pueden derivar en un aumento en la resistencia al tratamiento dirigido contra este receptor así como mantener una señalización sostenida que incrementa la proliferación celular, esto principalmente en cáncer de pulmón de células no pequeñas, por otra parte se ha observado incluso que las células tumorales son capaces de inducir proliferación celular a través de integrinas, las cuales son glicoproteínas que participan tanto en la unión célula - célula como en la interacción de las células con la matriz extracelular [31-32]. Finalmente, uno de los mecanismos más complejos de adquisición de autosuficiencia de señales de proliferación involucra la ruta de señalización SOS-Ras-Raf-MAPK donde se ha reportado que cerca del 25% de los casos de cáncer presentan alteraciones estructurales en la proteína Ras [33-35]. Esta cascada de señalización incluso se entrecruza con otras rutas de señalización que regulan diferentes procesos importantes en cáncer, por ejemplo la proteína RAS puede interaccionar directamente con la cinasa PI3, promover y activar la sobrevivencia celular.

1.3.2. Insensibilidad a las señales anti-crecimiento

Como ya se ha mencionado los procesos de crecimiento y proliferación en células normales son mecanismos altamente regulados, para ello se ha visto que dentro

de un tejido normal operan múltiples señales anti-proliferativas para mantener las células en estado quiescente y la homeostasis tisular; muchos de estos procesos dependen de la actividad de los supresores de tumor, estos supresores de tumor van a actuar dentro de la célula mediante diferentes rutas. Dos de los genes supresores de tumor más conocidos son; los que codifican para la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y P53 estas funcionan como nodos centrales de control regulando los circuitos que gobiernan o deciden si una célula prolifera, se va a senescencia o a muerte celular programada por apoptosis. El gen codificante para la proteína RB se encuentra alterada en diversos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstatas, cáncer gástrico, cáncer de mama [36-38] entre otros, RB es capaz de integrar señales antiproliferativas de distintos orígenes, tanto extracelular como intracelular, una de las principales funciones de RB es la de inhibir la progresión del ciclo celular antes de que la célula entre en mitosis esto mediante su interacción (inactivación) con algunos miembros de los factor de transcripción E2F (E2F1, E2F2, E2F3 y E2F4) quienes funcionan como activadores transcripcionales de genes necesarios para que la célula entre en fase S, de tal manera que la célula no se divide, RB por lo tanto impide proliferación celular [39]. Por otra parte P53 es una proteína que censa tanto el estrés celular como el daño a DNA, por lo tanto si una célula estuviera bajo estrés intenso o recibiera mucho daño a DNA, P53 es capaz de detener el ciclo celular hasta que nuevamente haya condiciones normales en la célula y que el daño generado al DNA haya sido reparado, de otra manera si existen condiciones anormales en la célula y si la cantidad de daño generado a DNA es

irreparable, P53 puede activar el proceso de muerte programada y llevar a la célula comprometida a apoptosis. Por lo tanto P53 es un importante supresor de tumor que además de inducir arresto del ciclo celular y activar apoptosis es capaz de activar el estado de senescencia, reparación de daño a DNA o promover cambios metabólicos en la célula. La eliminación de p53 funcional medida por mutaciones promueve la división celular sostenida incluso en la presencia de daño al ADN. Así mismo se ha demostrado que la inactivación de p53 incrementa la inestabilidad genética por lo que un aumento de mutaciones y aneuploidía son comunes en células tumorales con mutaciones en *p53*. Se ha observado que mutaciones y la consecutiva pérdida de función de este supresor de tumor está asociado a una gran variedad de tipos de cáncer, incluyendo algunos de tipo hereditario como el síndrome de Li-Fraumeni [40-41].

1.3.3. Evasión a los procesos de muerte celular programada (Apoptosis).

Gran parte de la capacidad de una célula tumoral para expandirse y dividirse de forma ilimitada esta mediada por su tasa de proliferación celular, así como de su capacidad para ignorar señales anti-crecimiento, así como su capacidad de acumular desgaste o daño a DNA sin activar el proceso de muerte celular programada o apoptosis. La maquinaria implicada en el proceso de apoptosis puede dividirse en 2 grandes grupos de componente, sensores y efectores. Donde los sensores, son responsables de monitorear las condiciones ambientales tanto de manera extracelular como intracelular y dependiendo si hay condiciones normales o anormales estas pueden influir entre que una célula viva o muera, los sensores entonces transmitirán señales que regularan la actividad del segundo

grupo, los cuales funcionan como efectores de muerte celular mediada por apoptosis. La mayoría de los sensores incluyen receptores de superficie estos son capaces de unirse a moléculas o ligandos que pueden promover tanto sobrevivencia como muerte celular, algunos ejemplos de estos ligandos/receptores son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1/IGF2) y su receptor IGF-R1, interleucina 3 (IL3) y su receptor ILR-3, que promueven sobrevivencia, ligando de FAS y su receptor de ligando de FAS, factor de necrosis tumoral α (TNF α) y su receptor TNFR1 los cuales promueven muerte celular, los sensores intracelulares monitorean el interior de la célula y activan muerte celular en respuesta a la detección de anomalías como puede ser daño a DNA o una inadecuada señalización provocada por oncogenes, insuficiencia del factor de sobrevivencia o hipoxia, así mismo la pérdida de interacción célula-célula o con proteínas de matriz extracelular, pueden desencadenar el proceso de apoptosis. Gran parte de las señales de activación de apoptosis convergen en la mitocondria, la cual responde a las señales pro-apoptóticas despolarizando su membrana y liberando al citoplasma citocromo C, el cual es un potente catalizador de la apoptosis. Bcl2 es una familia de proteínas que juegan un papel importante en la tanto en la regulación de la apoptosis, donde Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W y MCL1 poseen actividad anti-apoptótica y Bax, Bak, Bid y Bim pro-apoptótica. Por lo que alteraciones en la expresión y función de estas proteínas, pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer. El papel que juega Bcl2 en cáncer fue demostrado desde que se descubrió, que formaba parte de una translocación entre el cromosoma 14 y 18 en linfoma no Hodgkin, en esta translocación el gen

correspondiente a Bcl2 localizado en el cromosoma 18 era fusionado con un gen codificante de la cadena pesada de una inmunoglobulina en el cromosoma 14, desregulando la expresión de Bcl2 a nivel transcripcional, sumado a esto se ha observado amplificación génica de *bcl2* en distintos tipos de cáncer [42-45]. Por lo que la sobreexpresión de Bcl2, Bcl2XL y MCL1 sumado a la inactivación del receptor de ligando de FAS, TNFR1 (sensores externos) e inactivación de RB y P53 (sensores internos de daño a DNA) promueven de manera sinérgica una alta tasa de sobrevivencia en las células tumorales, al poder esta evadir apoptosis [46-48].

1.3.4. Ilimitado potencial replicativo.

Hasta ahora se han explicado 3 capacidades adquiridas por la célula tumoral: autonomía de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-proliferativas y resistencia a la apoptosis, las cuales participan de manera sinérgica promoviendo el desarrollo tumoral. En principio solo la capacidad adquirida de autonomía de señales de proliferación, debería ser suficiente para generar y mantener una vasta cantidad de células tumorales, sin embargo se ha observado que todos los tipos celulares de los mamíferos poseen un programa celular autónomo intrínseco que limita su multiplicación, y que este programa es independiente de las interacciones o estímulos del tipo célula-célula como los que se han mencionado anteriormente. De manera natural, las células normales poseen un potencial replicativo limitado o finito (60-70 duplicaciones), una vez que una población de células ha multiplicado su número a través de cierta cantidad de divisiones, estas detienen su crecimiento y entran en estado de senescencia, se

ha observado que al silenciar a los genes *rb* y *p53* en un cultivo de fibroblastos que ha entrado en estado de senescencia, estas pueden continuar dividiéndose algunas veces más pero después entran en un estado denominado “estado de crisis” donde las células empiezan a morir de manera masiva, un desarreglo cariotipico donde hay fusión de cromosomas, es asociado a este estado y se ha observado que ocasionalmente (1 en 10^7 células) se genera una célula adquiere la capacidad de dividirse de manera ilimitada, a lo cual se denomina inmortalidad, de manera interesante se ha observado que la mayoría de las células que forman un tumor son capaces de dividirse de manera ilimitado indicando que la inmortalidad es un fenotipo propio del cáncer, esto sugiere que en el proceso de carcinogénesis en algún punto del paso de progresión, una población de células pre-malignas pasa por una serie de divisiones exhaustivas hasta que se genera una célula con capacidad replicativa ilimitada. Una característica interesante que fue descubierta en las células tumorales fue su alta tasa de regeneración telomérica. Los telómeros son secuencias ADN no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas. La longitud de los telómeros va a ser diferente, dependiendo de la especie y el cromosoma en que se encuentran. En general en el ser humano el ADN telomérico (ADNt) está formado por la repetición en tándem de la secuencia telomérica “TTAGGG/AATCCC” que se encuentra repetida unas 2000 veces. Los telómeros están implicados en numerosas funciones celulares relacionadas con la estabilidad de los cromosomas y la división celular, mientras que en una célula normal se pierden alrededor de 200 pb por cada vez que la célula se replica en las células tumorales hay una

recuperación de entre el 80 y 90 % de los telómeros perdidos, esto debido a la sobreexpresión de la enzima telomerasa, la cual adiciona hexámeros de nucleótidos repetidos a los telómeros [49-50].

1.3.5. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso mediante el cual hay generación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes [51-53]. Por otro lado la angiogénesis tumoral es el proceso mediante el cual las células tumorales inducen la proliferación y migración de las células endoteliales cercanas, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos los cuales van a suplir de nutrientes y oxígeno al tumor permitiendo su desarrollo y crecimiento [54]. Este proceso inicia cuando las células tumorales liberan proteínas que envían señales al tejido circundante. Esta señalización activa genes específicos que a su vez producen proteínas para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis se activa también en los tejidos hipóxicos los cuales necesitan nuevos vasos sanguíneos para mantener una oxigenación adecuada. Cuando un tejido se encuentra en hipoxia se activan mecanismos sensores de oxígeno los cuales inducen la expresión de proteínas pro-angiogénicas. Dentro de los primeros factores activados se encuentran los denominados HIFs (hipoxia inducible factor) [55-56] los cuales promueven de manera directa o indirecta la expresión de múltiples genes proangiogénicos. El proceso de angiogénesis es un proceso complejo donde participan un gran número de receptores (TGFR1, TGFR2, TIE1, TIE2, FGFR y VEGFR) ligandos y factores de transcripción (TGF β , VEGFA, ANG1, HIF α , FGF y CREB1). De manera importante la angiogénesis se

acompaña de otros eventos celulares tales como la proliferación, motilidad celular e invasión mediados por la activación de rutas de señalización comunes tales como las de PI3K, VEGF, AKT/PKB y TGF β .

1.3.6. Metástasis

La metástasis es el proceso mediante el cual las células tumorales son capaces de invadir tejidos adyacentes al sitio en donde se generó el tumor y posteriormente otros órganos y establecer un nuevo tumor (tumor secundario). Para que esto pueda suceder las células tumorales deben ser capaces de liberarse de las interacciones célula-célula así como de su interacción con proteínas propias de la matriz extracelular así mismo las células tumorales deben poseer la capacidad de transformarse de un estado celular definido y especializado (célula epitelial) a un estado más dinámico, migrante y que presenta algunas características similares de las células madre (mesenquimal) esto último se le conoce como transición epitelial-mesenquimal (TEM). Una de las alteraciones más conocidas que se encuentran relacionadas con el proceso de metástasis es la pérdida de la expresión de la proteína E-cadherina, la cual participa en las uniones adherente entre célula-célula. Se ha observado que la formación de uniones adherentes entre células esta mediada por la E-cadherina la cual ayuda a mantener el estado quiescente entre las células epiteliales. Por otra parte hay un incremento en la expresión de la proteína N-cadherina, la cual se expresa normalmente en neuronas migrantes o en células mesenquimales durante el proceso de angiogénesis. La sobreexpresión esta mediada por factores de transcripción que regulan la TEM como son Snail, Slug, Twist y Zeb 1/2 [57]. Así

mismo una vez que la célula a migrado a otro tejido u órgano, estas nuevamente se transforman de células mesenquimales a células epiteliales este proceso es llamado transición mesenquimal–epitelial (TME), para una vez más activar su ciclo replicación, proliferar y formar un nuevo tumor, de manera general se piensa que el proceso de metástasis se lleva a cabo a través de un largo proceso denominado “cascada metastásica” de la cual se identifican diversos pasos los cuales son:

- Desarrollo y crecimiento del tumor primario.
- Transformación de células epiteliales a mesenquimales, remodelación de la matriz extracelular y ruptura de la lamina basal
- Intravasación al sistema circulatorio o linfático.
- Circulación y sobrevivencia de la célula tumoral en el sistema circulatorio.
- Extravasación al parénquima del tejido
- Transición mesenquimal-epitelial y supervivencia al nuevo microambiente
- Reiniciación de programa proliferativo.

Las células estromales juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta cascada, ya que al tener características similares a las de células madre, pueden diferenciar a fibroblastos, osteoblastos, adipocitos etc, además de que con capaces de liberar al medio factores importantes para el desarrollo tumoral como son factor estimulante de colonias (CSF-1), Angiopoyetinas (ANGPT) así como metaloproteasas (MMP) .

1.3.7 Inestabilidad genómica.

Previamente ha sido reportado que la inestabilidad genómica es una característica importante en el proceso de carcinogénesis. En células tumorales existen principalmente 2 tipos de inestabilidad genómica, mediada por 2 vías diferentes estas son: inestabilidad a nivel cromosómico (Translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidias) y la inestabilidad a nivel de DNA (Mutaciones puntuales, deleciones/inserciones). Dichos rearrreglos cromosómicos o mutaciones al azar le van a brindar a la célula tumoral la variabilidad genética necesaria para conferirle ventajas selectivas que le van a permitir proliferar y expandirse. Se ha observado que para que exista la inestabilidad genética deben generarse ciertos defectos o mutaciones en genes relacionados con la detección (p53) y reparación del daño a DNA lo cual por un lado puede incrementar la tasa de reparación de daño a DNA (sobreexpresión del complejo MRN) pero esta reparación es ineficiente o defectuosa, promoviendo o generando la aparición de nuevas mutaciones.

1.3.8 Inflamación tumoral

En condiciones normales la inflamación es una poderosa arma de nuestro sistema inmune. Es una respuesta aguda, agresiva, rápida e inespecífica contra microorganismos y cuerpos extraños. La inflamación sólo ocurre en tejido conectivo vascularizado y sus síntomas más característicos son el dolor e hinchazón. La inflamación asociada a tumor es un proceso que se ha observado comúnmente en distintos tipos de cáncer, se piensa que el proceso inflamatorio en si genera las condiciones de microambiente necesarias para promover la

tumorigenesis así como facilitar la progresión del tumor. Esto es debido a que durante el proceso de inflamación, las células liberan al medio moléculas bioactivas como factores de crecimiento y factores que promueven la proliferación celular, factores de sobrevivencia, factores pro-angiogenicos, así como enzimas para remodelar matriz extracelular y la señalización necesaria para facilitar la TEM, la invasión y la metástasis. Así mismo oncogenes como la β -cateína puede disparar la inflamación tumoral volviendo más agresivos algunos tipos de tumores. De manera similar se sabe existen células que juegan un papel importante en el proceso de inflamación como los macrófagos, los cuales han sido asociados con procesos de inflamación crónica en cáncer colorectal [59-61].

1.3.9. Desregulación metabólica y energética.

Es claro que al aumentar la tasa de replicación celular y mantener un nivel de proliferación alto, la célula tumoral debe generar algunos ajustes en los mecanismos involucrados en su metabolismo. De manera normal las células en condiciones aeróbicas procesan la glucosa, transformándola primero en piruvato vía glucolisis en el citoplasma para posteriormente a energía donde en condiciones anaerobias el proceso de glucolisis es favorecido. Otto Warburg fue el primero en observar las características anómalas de las células tumorales con respecto al metabolismo energético, donde las células tumorales incluso en presencia de oxígeno son capaces de reprogramar el metabolismo de la glucosa y por lo tanto su obtención de energía. De hecho un alto consumo de glucosa ha sido reportado en distintos tipos de tumores. La alta tasa glucolítica puede verse influenciada bajo las condiciones de hipoxia, en las que se encuentran la mayoría

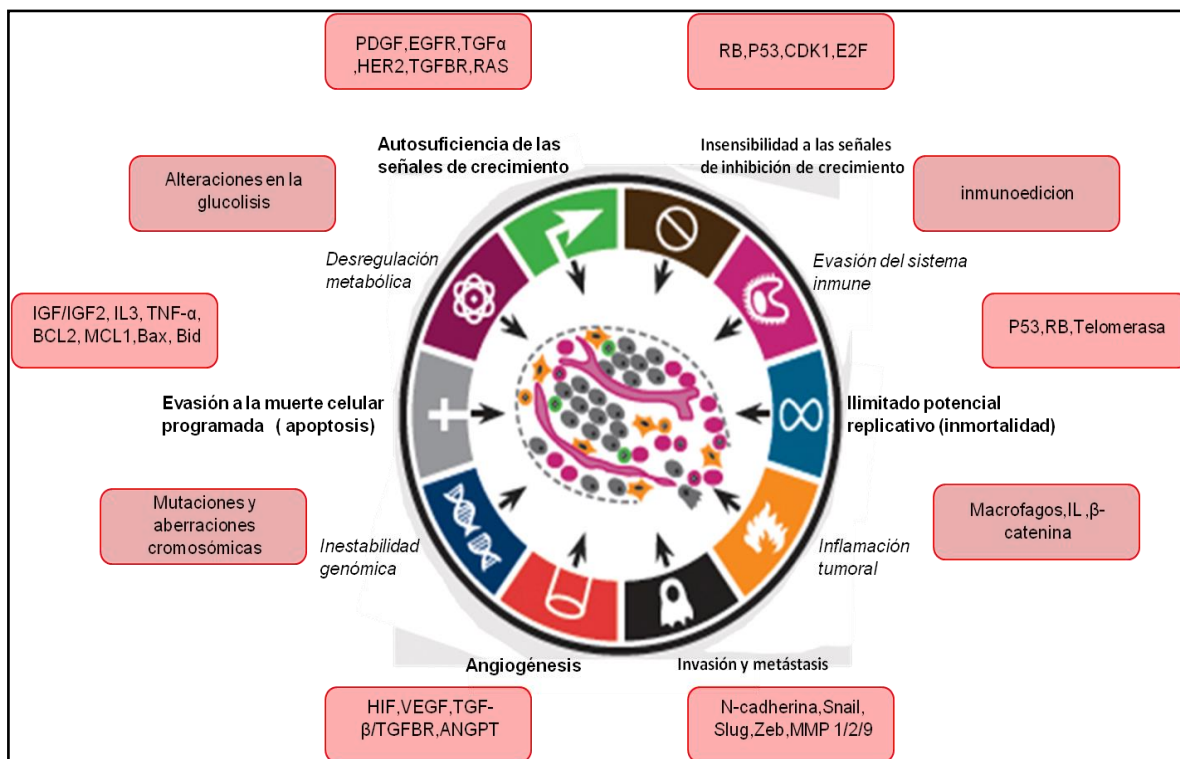


Figura 3. Los hallmarks del cáncer. En la figura se esquematizan los 10 hallmarks de cancer descritos por Hanahan y Weinberg en los recuadros rosas se enlistan algunos genes o procesos celulares que juegan un papel importante en cada uno de los hallmarks. Tomado y editado de Hanahan & Weinberg Cell. 2011

de los tumores, los sistemas de respuesta a hipoxia actúan promoviendo un incremento en la expresión de genes que codifican para transportadores de glucosa y múltiples enzimas involucradas en la ruta de la glucólisis, así mismo se ha observado que el oncogén RAS es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción inducido de hipoxia (HIF- α 1/2) el cual puede incrementar o el proceso de glucólisis [62-65].

1.3.10. Evasión a la destrucción por el sistema inmune.

Durante en desarrollo del cáncer el sistema inmune del huésped responde contra el tumor a través de la activación tanto del sistema inmune innato como adaptativo, y esto se realiza mediante 3 etapas principalmente. En la primera denominada “Eliminación” las células tumorales son identificadas y destruidas, en este paso participan un gran número de componentes, tanto moléculas (interferon gamma (INF- γ), perforinas, FAS/FASL TRAIL) como células (T CD8, granulocitos, macrófagos y células NK). En este paso generalmente se eliminan todas las células malignas sin embargo, si alguna célula con características tumorales sobrevive a este primer ataque pasara a la etapa de “equilibrio” donde ocurre un proceso denominado “edición”, en donde las células tumorales empiezan nuevamente a proliferar y las células del sistema inmune hacen una selección eliminando aquellas células con antígenos tumorales fuertes y soportando a aquellas que tienen una baja expresión de antígenos tumorales. En esta etapa se sabe que hay un incremento en la concentración de IL-23, IL10. Finalmente la fase de “escape” es en la cual las células que fueron seleccionadas por la presión del sistema inmune se empiezan a desarrollar, crecer y a generar un

micro ambiente inmunosupresivo mediante la expresión de moduladores inmunológicos como IDO, PD-1/PD-L1, Tim-3/ galectin-9, LAG-3). La mayoría de estas células tienen como característica la ausencia de antígenos tumorales fuertes así como baja expresión de MHC tipo 1, también presentan una alta expresión de STAT-3 y Bcl2. A todo este proceso de 3 etapas se le ha denominado inmunoedición tumoral [66-68].

1.4. El cáncer a nivel mundial

Según reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer se encuentra entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En el año 2012 se reportaron alrededor de 14.1 millones de nuevos casos, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas viviendo con cáncer (durante un periodo 5 años a partir del diagnósticos) de estos el 57% (8 millones) de nuevos casos, 65% (5.3 millones) de muertes por cáncer y 48% (15.6 millones) de los casos con prevalencia a 5 años ocurrieron en regiones menos desarrolladas.

Se pronostica que el número de nuevos casos incrementara un 70% en los próximos 20 años, así mismo la tasa de incidencia global de cáncer estandarizada por edad es un 25% mayor en hombres que en mujeres, con tasas de 205 y 165 por cada 100,000 respectivamente. Los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en hombres a nivel mundial en el año 2012 fueron Cáncer de pulmón, próstata, colon y recto, estomago e hígado y en mujeres fueron el cáncer de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estomago (Figura 4).

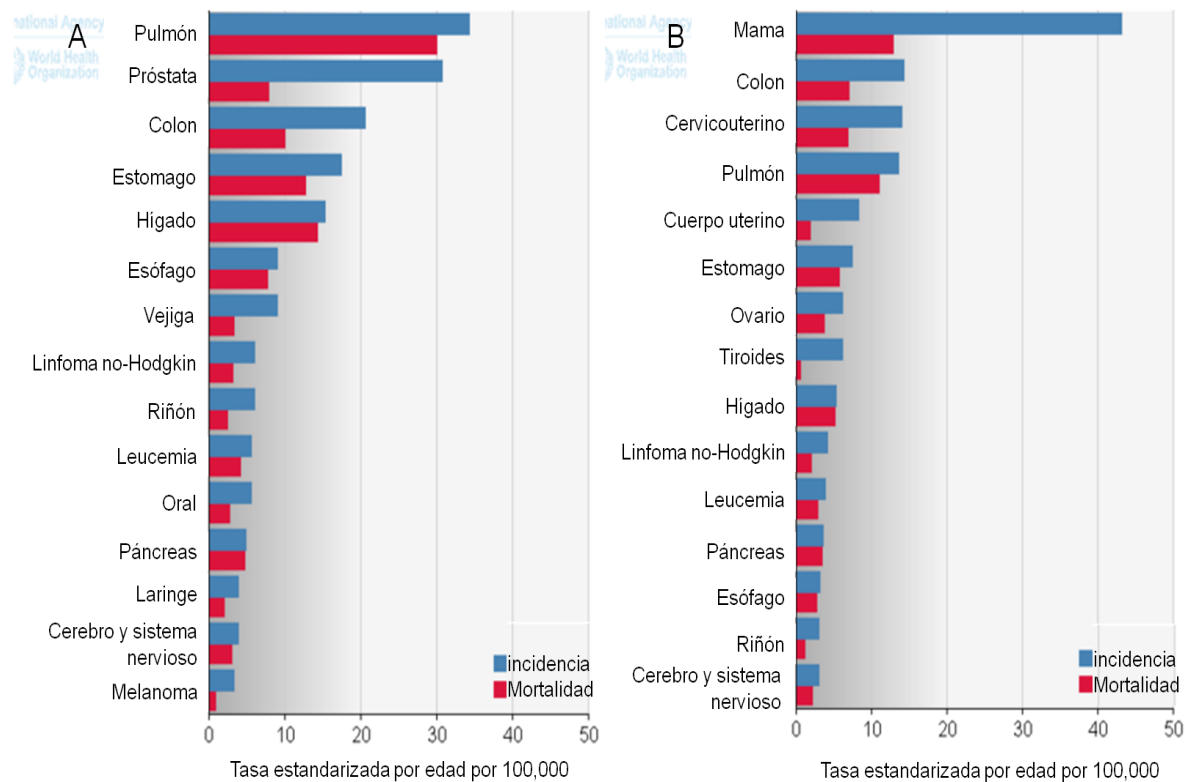


Figura 4. Principales tipos de cáncer a nivel mundial en hombres y mujeres.

Tomado y editado de GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11

1.5. Cáncer de mama.

El cáncer de mama (CM) es una neoplasia maligna que tiene su origen en los tejidos de la mama, principalmente en los ductos y en los lobulillos mamarios [1], donde la mayoría de los casos de cáncer de mama se presentan en los ductos (80% de los casos) y el resto son lobulillares. Entre el 15 al 30% corresponden a carcinomas *in situ* y el resto son infiltrantes[2]. No sólo las mujeres desarrollan cáncer de mama, también lo llegan a desarrollar en individuos del sexo masculino, pero en una incidencia muy baja (1%). A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más común entre mujeres, ya que representa uno de cada diez casos nuevos diagnosticados y casi uno de cada cuatro neoplasias en mujeres. Cada año, el cáncer de mama es diagnosticado en 1.1 millones de mujeres en todo el mundo [69-70].

En México desde el 2002 el CM es la primera causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres. En el año 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas por cáncer de mama cifra que ha ido en aumento ya que para el año 2012 se registraron más de 5000 muertes por CM en nuestro país lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas (Tabla I). Por otro lado el CM representa una fuerte carga social y económica en México. Se estima que el número de años de vida productiva perdidos (AVPP) en mujeres con CM es de 21 años, esto se traduce en que el costo global para el país por los AVPP es de \$2,748,732.00 pesos. Además, se estima que existen alrededor de 15.4 millones de mujeres mayores de 35 años, es decir, en riesgo para desarrollar CM. de ellas 1.78 millones son habitantes de la Ciudad de México.

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial y en México.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

Región o País	Incidencia	Mortalidad
Mundial	1,671,149	521,907
Mas desarrollados	692,634	189,455
Menos desarrollados	691,521	269,048
México	20,444	5,680

El CM representa una importante causa de muertes prematuras, debido a que el 60% de las mujeres que fallece oscila entre 30 y 59 años de edad. También existe evidencia de que la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en las mujeres de países en desarrollo en comparación con las mujeres de países más desarrollados [71].

1.5.1 Factores de riesgo en cáncer de mama.

Por estudios epidemiológicos se han identificado una serie de factores que aumentan el riesgo de padecer CM. Dentro de estos factores se encuentra la edad, la cual aumenta el riesgo a desarrollar CM a medida que se envejece [72], el género y la raza; además de los factores hormonales y reproductivos que determinan el tiempo de exposición a hormonas esteroideas. También, se ha asociado un mayor riesgo de padecer CM en países con una dieta rica en grasas y como factor protector el tener una dieta rica en frutas y vegetales. Por otro lado se ha observado que la actividad física actúa como factor protector [73]. También se ha observado que poseer historia familiar de CM es un factor de riesgo significativo para esta enfermedad, 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 aumenta de forma considerable el riesgo. Los genes afectados en el CM hereditario son a menudo los mismos que están mutados en CM esporádico.

1.5.2. Clasificación del cáncer de mama

El CM es una enfermedad heterogénea representada por un amplio espectro de características moleculares e histopatológicas que resultan en diversos comportamientos clínicos [28]. Los tumores de CM pueden ser clasificados de manera inicial con base en las características histopatológicas que presenta clasificándolos en: carcinomas *in situ* (CIS) el cual aún no rompe la lámina basal por lo cual se le considera como no invasivo, aproximadamente el 35% de los carcinomas que se diagnostican en México son CIS y carcinomas infiltrantes los cuales ya han roto la lámina basal y han invadido otros tejidos dentro de la mama. Otra clasificación de CM es mediante análisis inmunohistoquímico la cual se realiza mediante el análisis de la expresión de algunos receptores de interés como pueden la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal 2,(HER2) receptores a hormonas esteroideas: receptor a estrógenos (ER) y receptor a progesterona (PR). Se consideran triple negativo cuando hay ausencia en la expresión de estos tres receptores. Los tumores de CM también son clasificados con base en sus perfiles de expresión genómica obtenidos mediante el uso de microarreglos de DNA, los subtipos tumorales que presentan expresión del receptor a estrógenos positivo (ER+) luminal A y B donde los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a las células normales que recubren los conductos y las glándulas del seno (el interior de un conducto o glándula es llamado su lumen). Los cánceres luminal A son de bajo grado, suelen crecer con bastante lentitud, y tienen el mejor pronóstico. Los cánceres luminal B generalmente crecen con un poco más de rapidez que los luminal A, y el

pronóstico no es tan favorable, por otro lado los subtipos tumorales que no presentan expresión del receptor a estrógenos (ER-) son normal breast-like, ERBB2 y basal-like, donde el subtipo ERBB2 tienen copias adicionales del gen HER2 y algunas veces otros genes. Por lo general, estos cánceres tienen una apariencia de alto grado cuando son observados con el microscopio. Se ha determinado que el grupo basal-like está enriquecido en tumores de CM triples negativos los cuales poseen un comportamiento más agresivo, aparecen en mujeres jóvenes, presentan un patrón de metástasis diferente y predicen un mal pronóstico a pesar de responder inicialmente a la quimioterapia.

Otro parámetro importante en la clasificación del CM es el estadio o etapa clínica la cual sirve para evaluar el estado de avance de algún tumor. 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) clasificación TNM. El conjunto de estos caracteres determina el estadio en el cual se encuentra el tumor representado por un valor numérico entre el 0 y IV. Donde el estadio 0 representa un carcinoma no invasivo o in situ, mientras que el estadio IV representa a un carcinoma que ya ha hecho metástasis a otros órganos. En la tabla 2 se describen las características de cada estadio clínico.

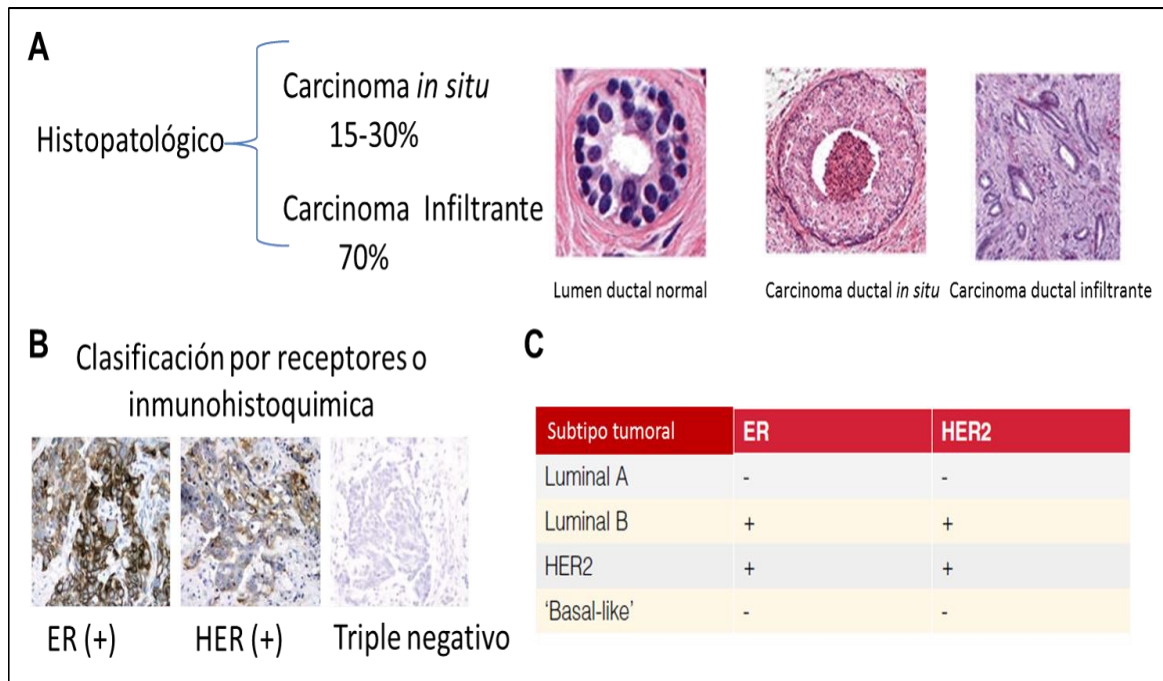


Figura 5. Clasificación del cáncer de mama. A) clasificación con base en sus características histopatológicas B) clasificación con base en la expresión de receptores ER, PR y HER C) clasificación con base en perfiles de expresión génica. Imágenes tomadas de The human protein atlas, 2015

Tabla 2. Estadio clínico y características tumorales

Estadio	Tamaño del tumor	Nódulos	Metástasis
0	<i>In situ</i>	No	No
I	≤ 2 cm	No	No
IIA	≤ 2 cm	Si	No
	÷ 2 y 5 cm	No	No
IIB	÷ 2 y 5 cm	Si	No
	> 5 cm	No	No
IIIA	÷ 2 y 5 cm	Si, axilares	No
	> 5 cm	Si	No
IIIB	Cualquiera	Si, torax	No
IV	Cualquiera	Si	Si

1.5.3. Tratamiento del cáncer de mama.

El tratamiento de CM se define con base en el grado, clasificación y estado del tumor en el paciente. Este puede ser muy variado e inicialmente incluye una intervención quirúrgica, radioterapia y la administración de la combinación de fármacos o compuestos. El tipo de terapia se divide principalmente en tres tipos: neoadyuvante, adyuvante y paliativa.

La **terapia neoadyuvante** está indicada a pacientes que aún no han sido intervenidos quirúrgicamente y principalmente se enfoca a reducir el tamaño del tumor lo cual permite un mayor éxito en una de cirugía conservadora. El tratamiento neoadyuvante está basado en el uso de antraciclinas y se ha observado el aumento en la eficacia de la terapia neoadyuvante al agregar taxanos como docetaxel o paclitaxel (taxol) lo cual ha incrementado número de cirugías conservadoras.

La **terapia adyuvante** está indicada a pacientes que ya han sido intervenidos quirúrgicamente, en aquellas pacientes que presenten metástasis a los ganglios axilares en la pieza quirúrgica y en aquellas con ganglios positivos. Este tipo de terapia está enfocada a la eliminación de células cancerígenas remanentes, evitar enfermedad micro-metastásica, disminuir el riesgo de recurrencia e incrementar la supervivencia. Los consensos internacionales recomiendan la utilización de tratamiento adyuvante cuando exista al menos uno de los siguientes factores: i) tumor mayor a 1 cm; ii) receptores hormonales negativos; iii) ser un paciente menor a 35 años; iv) pacientes que sobreexpresan el oncogen *HER2* y v)

tumores con invasión vascular o linfática. El tratamiento adyuvante debe administrarse durante 1 a 4 semanas después de la intervención quirúrgica. Los esquemas de quimioterapia recomendados deberán incluir antraciclinas y se consideran esquemas combinatorios efectivos aquellos que incluyen FAC (5 fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida) o FEC (5 fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida). Estudios recientes demuestran el beneficio de agregar taxanos (docetaxel o paclitaxel) particularmente, en pacientes con ganglios positivos, ya sea junto con el antracíclico, como el esquema TAC (docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida) o de manera secuencial como adriamicina y ciclofosfamida (AC) x 4 ciclos, seguido de docetaxel x 4 ciclos o paclitaxel x 12 ciclos.

La **terapia paliativa**, se utiliza en pacientes con una enfermedad diseminada o con recaída, está indicada de primera línea ante tumores que presentan receptores hormonales negativos, enfermedad visceral, corto intervalo desde la cirugía o sintomatología relacionada con la recaída o la metástasis. Básicamente se administra para reducción de síntomas, incrementar la esperanza y calidad de vida.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Los miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños de entre 7 y 25 nucleótidos, no codificantes y que presentan una función regulatoria al unirse a la región 3'UTR de diversos transcritos induciendo su degradación o reprimiendo su traducción. Actualmente se conocen alrededor de 700 miRNAs codificados en el genoma humano pero se estima que debe haber alrededor de 1000 miRNAs [74] todos ellos con la capacidad de regular de manera negativa la expresión génica. Se sabe que más del 50% de los microRNA humanos se encuentran codificados dentro de intrones o en regiones codificantes y pueden contener sus propios promotores o co-transcribirse en conjunto con el gen hospedero. Los miRNAs se pueden agrupar en familias tomando como criterio la similitud de su secuencia y pueden estar aislados o agrupados en clusters. Se ha observado que un gran número de los miRNAs que han sido estudiados son capaces de controlar aspectos fundamentales del desarrollo, la apoptosis y el ciclo de división celular [75], por lo cual se ha podido relacionar a los miRNAs con el desarrollo de algunos tipos de cáncer debido a que pueden funcionar como oncogenes y genes supresores de tumor. Por ejemplo, la acumulación excesiva de un miRNA que regula la síntesis de un supresor de tumor puede promover el desarrollo del cáncer al disminuir la expresión del supresor de tumores. Por el contrario, la baja expresión de un miRNA que controla la expresión de un protooncogen puede conducir a la acumulación excesiva de esa proteína, favoreciendo la oncogénesis [76].

La asociación entre la expresión de miRNAs y el cáncer fue evidente al determinar que un gran número de genes que codifican para miRNAs se encuentran codificados en regiones del genoma que frecuentemente sufren alteraciones cromosómicas durante el proceso cancerígeno [77]. Por otra parte, hay indicios de que los miRNAs se asocian a la clasificación y 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. La mayoría de los miRNAs de una familia van a presentar secuencias y funciones muy similares entre ellos, por ejemplo se ha observado que la familia de miR-200 regula la TEM. Las consecuencias de la TEM es la pérdida de la expresión de la E-caderina, la cual funciona 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, por lo que el miR-200 inhibe la expresión de los factores ZEB en líneas celulares de pulmón y mama, lo que hace a miR-200 y a sus blancos atractivos para la terapia contra el cáncer [78].

2.1.2. microRNAs en el cáncer de mama.

Como ya se ha descrito previamente los miRNAs juegan un papel importante en la regulación de genes que juegan un papel importante en la modulación de los hallmarks del cáncer, de manera particular existen reportes que relacionan la desregulación de algunos miRNAs y el desarrollo y progresión del cáncer de

mama por ejemplo, se sabe que el aumento en la expresión de miR-373 y miR-520c promueve metástasis al inhibir la expresión de CD44 una proteína asociada al aumento en la supervivencia de los pacientes con CM [79]. En otro estudio, Ma y col encuentran un aumento en la expresión de miR-10b en tumores metastásicos de CM, lo cual induce un aumento de la metástasis y migración celular [80]. El miR-10b inhibe la traducción del RNAm homeobox D10, resultando en el aumento en la expresión del gen pro-metastásico RHOC. También se ha observado un aumento en la expresión de miR-21 en CM, lo cual origina la disminución de la proteína de muerte celular programada 4 (PCD4) y la tropomiosina 1 [81-82]. PCD4 es un supresor de tumor que inhibe el crecimiento celular. Otro reporte muestra que la expresión de miR-17-5p (mir-91) disminuye en tumores de CM [83].

El miR-17-5p reprime la traducción del gen AIB1 el cual es un coactivador del regulador del ciclo celular E2F1 y también induce la transcripción dependiente del receptor de estrógenos. Además, miR-20a y miR-17-5p regulan negativamente la expresión del gen de la ciclina D. Recientemente, Tavazoie y col., encontraron que pacientes con tumores de CM con baja expresión de miR-335 y miR-126 tienen mayor predisposición a desarrollar metástasis y migración a través de un mecanismo que involucra un aumento de la proteína de matriz extracelular tenascina C y el factor de transcripción SOX4 [84]. La disminución en la expresión de miR-126 fue asociada además a un aumento en la proliferación celular. De esta manera se concluye que miR-335 y miR-126 son importantes supresores de metástasis en CM. Estos constituyen algunos ejemplos de miRNAs desregulados en CM.

2.1.3. Biogénesis de los miRNAs.

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 de miR-132a. Sin embargo, la mayoría de los precursores de miRNAs están presentes en intrones y tienen la misma orientación que el gen en el que se encuentran, por lo que son co-transcritos como parte del RNAm. En algunos casos, los miRNA se traslapan o están integrados con exones de los transcritos, sin embargo en estos casos, están siempre en la misma orientación y se pueden encontrar también en las regiones no-codificantes 5'- o 3'-UTRs. El resto de los miRNAs se encuentran dentro de regiones intergénicas en clusters codificados como un transcrito policistrónico [85] (figura 6).

Los miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II como un transcrito largo el cual tiene una longitud superior al tamaño final del miRNA e incluye la región miRNA y una región que es complementaria a ella. Durante la transcripción de la secuencia se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla y generar un RNA primario bicatenario conocido como pri-miRNA. Los pri-miRNAs pueden ser policistrónicos conteniendo dos o más miRNAs, además de poseer CAP 5' y ser poliadenilados en su extremo 3' [86].

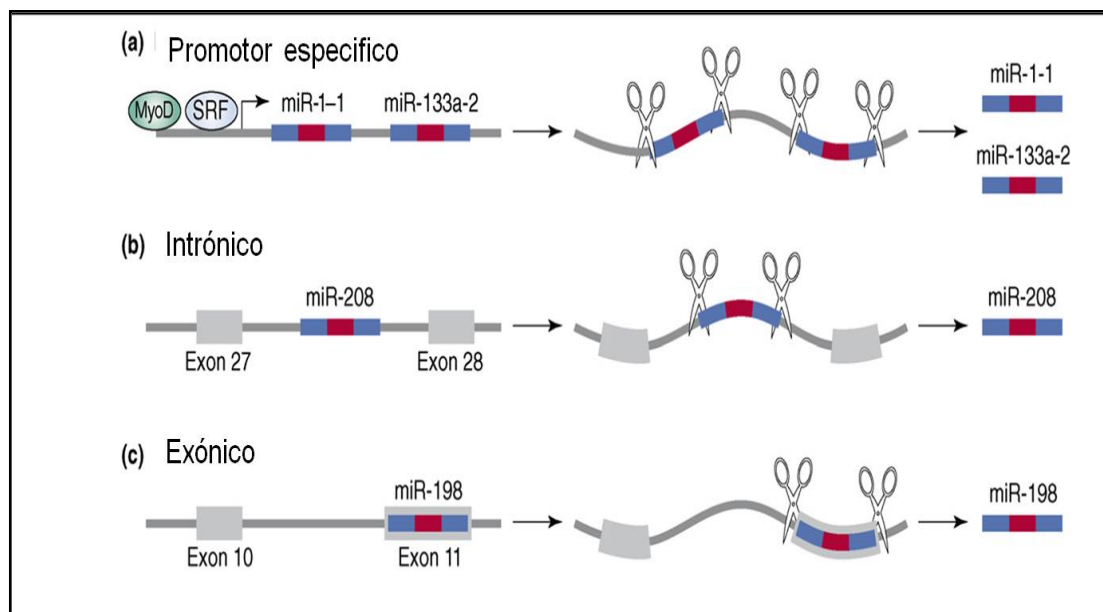


Figura 6. Localización genómica de los miRNAs. Más del 50% de los microRNA humanos están codificados en intrones de genes codificantes también puede poseer sus propios promotores e incluso estar en exones. Tomada de Yong Z. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2007.

Posterior a la síntesis del pri-miRNA, la estructura secundaria de tallo-burbuja es reconocida y liberada por el complejo microprocesador conformado por Drosha, una enzima RNasaIII y la proteína DGCR8 generando precursores de 70-100 pares de bases llamados pre-miRNAs. El pre-miRNA es una secuencia que se conforma de una estructura tallo burbuja con una prolongación de 2 nucleótidos en su extremo 3', a la cual se le especulan las funciones de indicar cual es la cadena guía o de señalar lapresencia de un RNA de doble cadena como elemento celular propio. Estos pre-miRNA son transportados al citoplasma, mediante la exportina 5 y Ran-GTP [87]. Ya en el citoplasma el pre-miRNA es procesado por DICER, otra enzima del tipo RNasaIII, que en conjunto con la proteína TRBP 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) [88]. La cadena complementaria del duplex miRNA/miRNA* es entonces liberada y degradada por AGO2 [89]. El complejo que contiene el miRNA maduro se denomina RISC (Complejo de Silenciamiento de RNA de Interferencia). RISC una vez activo, une el miRNA a su RNAm blanco, dándose de esta manera la represión basada en la complementariedad de la secuencia. Finalmente, los miRNAs podrían silenciar los RNAm blancos mediante un mecanismo ligado al secuestro del mensajero hacia los complejos o *foci* citoplásmicos denominados P-bodies o cuerpos de procesamiento donde los transcritos pueden ser degradados o almacenados [90] (Figura 7).

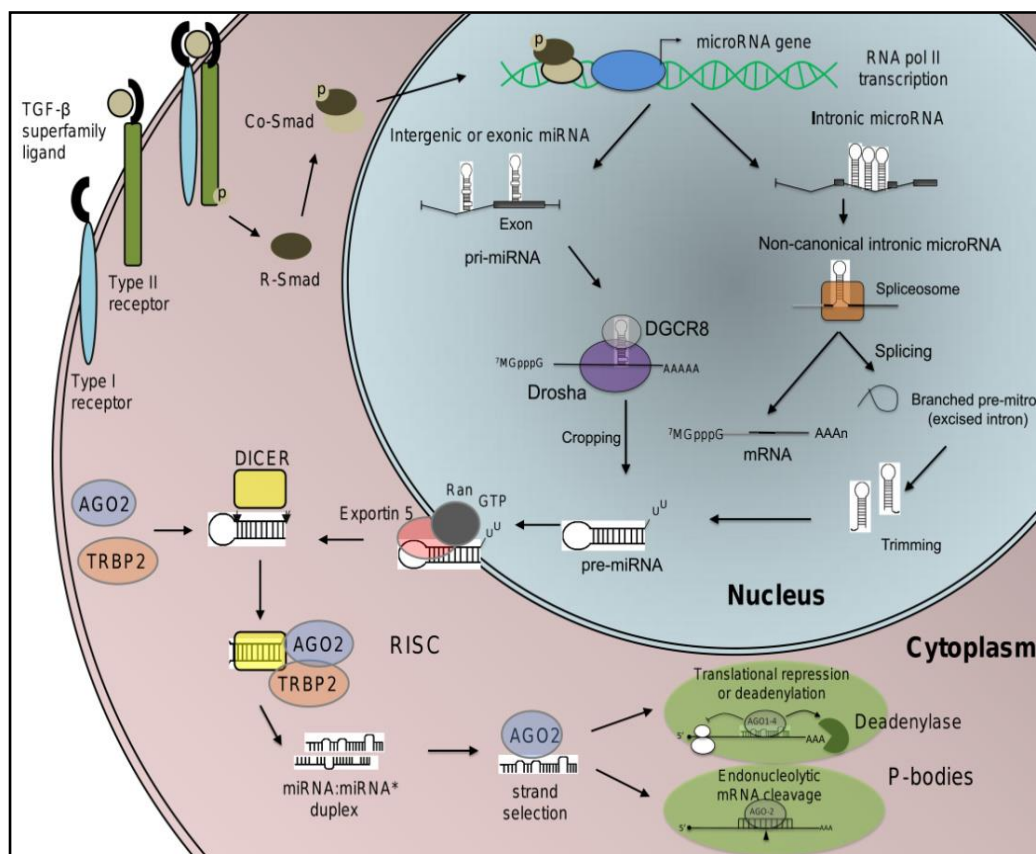


Figura 7. Representación esquemática de la biogénesis y modo de acción de los miRNAs de mamíferos. Los miRNAs van a ser transcritos por la RNA Pol II para generar el pri-miRNA. Canónicamente este pri-miRNA va a ser procesado por la endoribonucleasa Drosha en conjunto con la proteína DGCR8 la cual reconoce y se une al RNA de doble hebra, y facilita el corte mediado por Drosha; los mirtrones van a ser procesados mediante la maquinaria del espliceosoma de generando en ambas vías a el pre-miRNA el cual va a unirse a la exportina 5 mediante la cual el pre-miRNA es conducido al citoplasma donde será procesado por el complejo formado por Dicer, y TRBP para generar el miRNA maduro (21-23 nts) existen miRNAs que no son generados por Dicer sino que son procesados por la proteína AGO2. El miRNA maduro entonces se une a AGO1-4 formando el complejo RISC al cual se le puede unir la proteína GW182. Una vez formado el complejo RISC este puede generar desestabilización del mRNA inhibiendo la traducción y/o puede promover la degradación del mRNA mediado por AGO2. Por otra parte se ha descrito que la expresión de los miRNAs puede ser inducida o activada por la estimulación de factores de crecimiento como son PDGF y TGFβ seguido de la secuencial activación y fosforilación de los receptores tipo I y tipo II los cuales promoverán la fosforilación del factor de transcripción Smad el cual viajara al núcleo regulando la transcripción de los transcritos primarios de los miRNAs (López Camarillo intech 2013)

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. El microRNA-204 y cáncer

El miR-204 ha adquirido recientemente gran atención por su participación en la regulación de diferentes procesos celulares de gran importancia en el desarrollo y progresión de distintos tipos de cáncer. por ejemplo se ha reportado que el miR-204 es capaz de regular diferenciación celular mediante la regulación negativa del factor de transcripción RUNX2. Esta proteína es esencial para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis ósea debido a que modula la expresión de genes relacionados con diferenciación y remodelación del citoesqueleto en la célula. La deficiencia en la expresión de miR-204 en células progenitoras del mesenquima y células estromáticas de la medula ósea, inhibe la osteogenesis y promueve la adipogenesis alterando el proceso de diferenciación celular en estos tipos celulares [91]. Por otro lado se ha observado que la inhibición de la expresión del miR-204 está relacionada con el proceso de diferenciación celular denominado transición epitelial-mesenquimal, evento en el cual la células normales y tumorales son capaces de adquirir características propias de células mesenquimales como la pérdida de la polaridad celular, la capacidad de interacción con otras células, incrementa su capacidad de migración e invasión celular además disminuye los procesos relacionados con activación de la apoptosis, reorganización y expresión de proteínas involucradas en la remodelación de citoesqueleto y la adquisición de características similares a las observadas en células madre. Zhang y cols. demostraron que el restablecimiento de la expresión del miR-204 es capaz de revertir la transición epitelial-mesenquimal inducida por la proteína SIRT-1 la cual es blanco directo del miR-204 en células de cáncer gástrico. Así mismo se mostró que la sub-expresión del miR-204 promueve la resistencia a anoikis y promueve la invasión celular. De manera similar Ying y cols. mostraron que la ausencia de la expresión del miR-204 promueve la expresión de proteínas propias de células madre y células mesenquimales así como incremento de la migración celular en cáncer cerebral. También observaron que la sobreexpresión del miR-204 es capaz de revertir estos procesos mediante la regulación del factor de transcripción SOX4.

Por otra parte se ha observado que la sobreexpresión del miRNA 204 inhibe la expresión de FOXC1 disminuyendo la migración, invasión y adhesión en cáncer endometrial [92] por otra parte, Avellino y cols ha reportado que el miR-204 es capaz de regular a Ankrd13A el cual controla la formación y distribución de adhesiones focales en células mesenquimales del cristalino, donde la sobreexpresión del miR-204 inhibe migración celular y la transición epitalial-mesenquimal. Así mismo Conte y cols. ha reportado que la expresión del miR-204 es necesaria para el desarrollo óptimo de la retina y el cristalino vía regulación del gen Meis2. También se ha visto que la desregulación del miRNA-204 está relacionada con proliferación celular y resistencia a la apoptosis en células de musculo liso arteriopulmonar, cáncer gástrico y neuroblastoma (Couboulin 2011, Xiao 2011, Sacconi 2012) y se ha visto la relación de la expresión disminuida del miR-204 y la activación vía sobreexpresión de la proteína ezrin del oncogén RAS en cáncer gástrico [93]. Recientemente Imam y cols mostraron que el miR-204 se encuentra reprimido en cáncer de ovario, cáncer renal infantil y cáncer de mama. La pérdida en la expresión del miR-204 promueve la sobreexpresión del factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF) el cual es capaz de inducir migración e invasión celular mediante la activación de la GTPasa RAC1 la cual inducirá reorganización del citoesqueleto de actina a través de la ruta de señalización AKT/TOR lo que conduce a la inducción de la migración e invasión de las células HEK-293 de cáncer renal pediátrico [94].

Tabla 3. Blancos validados del miR-204 que participan en la regulación de los hallmarks del cáncer.

Tipo de tejidos, tumores o cáncer	Blancos validados	Fenotipo celular	Reporte
Cáncer de cabeza y cuello	FAP,MMP3, MMP9, BMP1, ERF, SOX4, CDH11,SHC1 LTBP1	Inhibición de la metástasis	Lee et al. Plos computational Biology 2012
Neuroblastoma	BCL2 y NTRK2	Activación de la apoptosis	Ryan British et al. Journal Cancer 2012
Glioma	SOX4	Inhibe migración	Ying et al. Cancer Res 2013
Cáncer Gástrico	EZR, SIRT1,BCL2	Inhibe proliferación migración e invasión . Induce anoikis y apoptosis.	Lam et al Am J Transl Res 2013 Zhang et al BMC Cancer 2013 Sacconi et al Cell Death and Disease 2012.
Tejido ocular	Sox11,BCL2,BIRC2,EZR, M6PR,Meis2, Ankrd13A	Modula desarrollo celular, apoptosis, diferenciación, migración	Shaham et al plos genetics 2013. Li et al 2011. Conte et al PNAS 2010, Avellino et al . PLOS ONE 2013.
Células estromales de medula ósea	RUNX2	Diferenciación celular	Huang et al. Stem cells 2011
Células musculoliso arteriopulmonar	SHP2	Proliferación celular	Courboulín et al. J. Exp. Med.2011
Cardiomiocitos	LC3-II	Apoptosis	Xiao et al. Journal of biomedical science 2011.
Sarcoma de tejido suave	RASF2, HMGA2	Proliferación, migración e invasión .	Gong et al. Neuro Oncology 2012.

3.2. El miRNA-204 y la angiogénesis

Como se ha visto anteriormente la angiogénesis es un proceso complejo donde participan un gran número moléculas relacionadas con el desarrollo y maduración de vasos sanguíneos. Las angiopoyetinas son una familia de proteínas que juegan un papel importante en el proceso de angiogénesis estas pueden actuar inhibidores de la angiogénesis o como factores pro-angiogenicos. La angiopoyetina 1 (ANGPT1) es una proteína que se une al receptor Tie-2 reduciendo la permeabilidad endotelial e incrementando la maduración y estabilización vascular actuando como agente pro-angiogenico. Previamente se ha reportado que la desregulación de la expresión de ANGPT1 ha sido relacionada con alta densidad y formación de micro-vasos sanguíneos en cáncer esofágico donde altos niveles de ANGPT1 fueron detectados mediante inmunoistoquímica en 42 de 45 biopsias tumorales [95] así mismo se reporto un alta expresión de 2 variantes del factor del crecimiento vascular endotelial (VEGF) VEGF121 y VEGF165, estos datos indican que la expresión de la ANGPT1 podría estar asociada con neo-vascularización mediada por VEGF, por otra parte se comprobó que al inhibir la expresión ANGPT1 mediante silenciamiento se logra disminuir la angiogenesis, proliferación celular y que además se promueve la activación de la apoptosis *in vivo* [96].

De manera interesante se ha observado que la sobreexpresión de la ANGPT1 en diferentes tipos tumorales genera resultados divergentes, restringiendo angiogenesis en algunos sistemas, mientras que promueve angiogenesis en otros.

por lo cual se planteó la teoría de que el efecto de ANGPT1/Tie1 pudiera ser contexto-dependiente. Algunos trabajos han demostrado que la sobreexpresión de la ANGPT1 restringe el crecimiento celular y angiogénesis en cáncer de colon, sin embargo en cáncer cervical, glioma y cáncer gástrico se ha reportado una correlación entre el sobre-expresión de VEGF, PDGF, TGFB1 y un incremento en la angiogénesis tumoral. Así mismo existe una correlación entre la sobreexpresión de ANGPT1/TIE2 y un mayor grado tumoral [97-98], mediante análisis bioinformático se determinó que la ANGPT1 posee 3 sitios de unión para el miR-204 lo cual lo hace un excelente candidato a ser regulado por este miRNA . Otro miembro de la familia de las angiopoyetinas es la angiopoyetina like 2 (ANGP2L) la cual se sobreexpresa en cáncer pulmonar y correlaciona con proliferación, metástasis y angiogénesis aberrantes [99].

Por otro lado se ha observado que el gen *tgfb β 2* juega un papel importante en distintos procesos celulares como son: proliferación migración, diferenciación y síntesis de matriz extracelular en células endoteliales y células de musculo liso vasculares. Dichos procesos son de gran importancia en el mecanismo de angiogenesis. Previamente hemos descrito el papel que juegan la superfamilia TGF β en el desarrollo de angiogenesis. algunos ligandos como BMP, TGF β y Activina se unen a receptores de tipo II como son BMPRII, TGFBR1,TGFBR2 y ActR-II respectivamente activando cascadas de señalización mediadas receptores de tipo I como ALK1-6 las cuales activaran los factores Smad 1-5 y finalmente se unirán Smad4 activando genes que regularan los procesos previamente señalados, [100] así mismo se ha reportado que TGFBR2 juega un papel dual en

cáncer, mientras que en etapas iniciales del cáncer juega un papel como supresor de tumor se ha reportado que en cáncer avanzado la sobreexpresión de TGFBR2 promueve proliferación celular y angiogénesis, comportándose oncogén. Finalmente otro gen que juega un papel importante en el desarrollo del cáncer es *foxc1*. Este gen ya ha sido relacionado con cáncer gástrico e hipertensión arteriopulmonar en donde participa promoviendo diferenciación celular y transición epitelial mesenquimal, así como inducir la expresión de metaloproteinasa de matriz 7 (MMP7) [101] así mismo se ha observado que FOXC1 es capaz de modular la angiogénesis en células cerebrales y en blanco validado directo del miRNA204 [102].

4. Importancia de continuar el estudio del tema.

Los miRNAs como reguladores negativos de la expresión génica han adquirido gran relevancia en el estudio del cáncer. Los miRNAs regulan la progresión tumoral, apoptosis, resistencia al tratamiento, senescencia, ciclo celular, diferenciación, proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis. En particular, la angiogénesis representa un proceso mediante el cual existe generación y proliferación de nuevos vasos sanguíneos los cuales van a promover el crecimiento tumoral. Representa un proceso clave en el establecimiento de metástasis a otros órganos por lo cual ha sido considerado como uno de los hallmarks del cáncer. Sin embargo, el papel de los microRNAs en el proceso de angiogénesis aún no ha sido bien establecido en CM por lo que sigue siendo un tópico de interés en oncología molecular.

Como previamente se ha expuesto, el cáncer de mama representa una carga tanto social como económica importante, así mismo en México representa la primera causa de muertes entre mujeres por tumores malignos puesto que según reportes del INEGI que cada 2 horas muere una mujer por cáncer de mama en nuestro país. Por lo que resulta importante todo esfuerzo y avance científico dirigido a mejorar la calidad de vida de las pacientes con esta enfermedad. En el presente trabajo proponemos estudiar los mecanismos básicos moleculares mediante los cuales el miR-204 regula migración, proliferación y angiogénesis, los cuales no han sido establecidos aún en cáncer de mama, y su conocimiento

podría utilizarse como base para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de mama en México.

II. OBJETIVOS

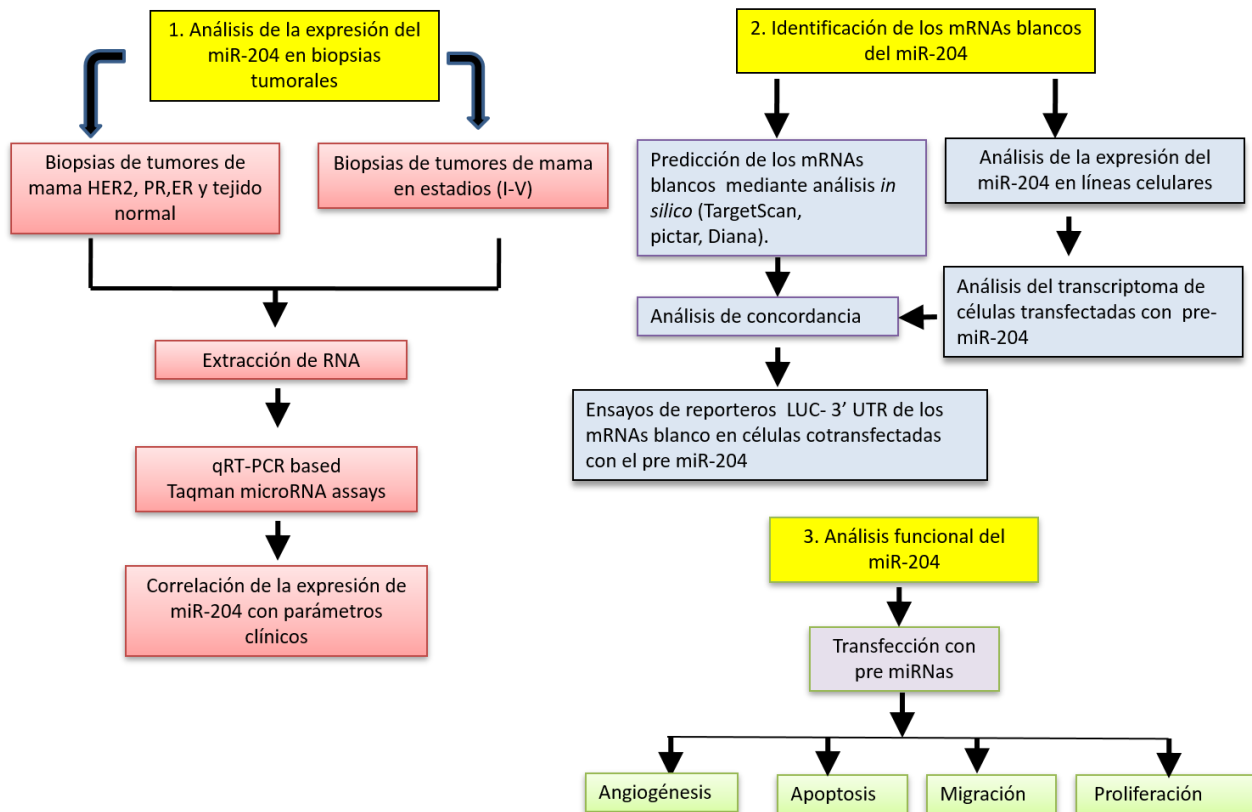
OBJETIVO GENERAL

Análisis funcional del microRNA-204 en cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión del miR-204 en tejidos mamarios tumorales, no tumorales y en líneas celulares de cáncer de mama.
2. Correlacionar la expresión del miR-204 con el estadio clínico (II-IV), y la presencia de receptores hormonales (ER, PR, HER2)
3. Identificar los mRNAs blanco del miR-204 mediante:
 - La predicción *in silico* de los mRNAs blanco y de las rutas biológicas potencialmente afectadas.
 - Análisis del transcriptoma de células transfectadas con el pre-miR-204 mediante el uso de microarreglos de DNA.
 - Ensayos de actividad de luciferasa mediante la transfección de plásmidos reporteros LUC-3'UTR en células transfectadas con el pre-miR-204.
4. Realizar el análisis funcional del miR-204 mediante la restauración de su expresión en líneas celulares. Analizando su efecto en procesos de importancia en cáncer de mama como: proliferación celular, migración, invasión, apoptosis, angiogénesis.

III. Estrategia Experimental



IV. MATERIAL Y METODOS

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

Las biopsias tumorales fueron obtenidas de operaciones de rutina de pacientes que fueron informadas para participar en el proyecto de investigación y firmaron una carta de consentimiento informado. Las biopsias de cáncer de mama y de tejido mamario adyacente normal que fueron usadas en este proyecto, 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, así mismo algunas biopsias fueron obtenidas del hospital Juárez de México y del instituto nacional de cancerología a través de colaboración. Se analizaron 58 biopsias de cáncer de mama y 26 biopsias de tejido mamario adyacente normal las cuales fueron tomadas a 5 cm del tumor para evitar la contaminación con tejido maligno. Tanto las biopsias de tejido mamario tumoral como las de tejido mamario normal fueron divididas en dos fragmentos de alrededor de 5-10 mg de tejido y embebidas un medio de criopreservación (Tissue-Tek) en criotubos de plástico con una capacidad de 1.5 ml. Posteriormente cada biopsia fue congelada mediante inmersión en nitrógeno líquido y finalmente almacenadas a -80°C para su preservación hasta la realización de los análisis correspondientes. De cada una de estas biopsias tanto tumorales como de tejido normal se obtuvieron RNA total y extracto proteicos totales como se detalla más adelante.

2. Estratificación de las biopsias

Se estableció como criterios de exclusión que las biopsias analizadas en este proyecto fueran de pacientes que no tuvieron tratamiento previo a la intervención quirúrgica, ya que el tratamiento con radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia podría inducir cambios en la expresión de los microRNAs. Adicionalmente se excluyeron a las 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. Así mismo aquellos pacientes con antecedentes de cáncer de mama familiar, con carcinoma ductal invasivo bilateral y con resultados anatomopatológicos de cáncer no confirmados fueron también excluidos, esto con el fin de asegurar de que las paciente solo presenten cáncer esporádico y de que el diagnóstico sea preciso.

Así mismo el patólogo evaluó cada biopsia tumoral y se tomaron en cuenta para este proyecto solo aquellas biopsias que contaran al menos con un 80% de células tumorales. Por otra parte también se recopilaron datos clínicos de cada biopsia, como estadio clínico (I,II,III) ,grado tumoral (1-3), clasificación histopatológica así como el estatus de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y el receptor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2)

3. Extracción de RNA total de biopsias mamarias tumorales y normales.

Previo a la lisis de tejido y extracción de RNA total, cada muestra fue sacada del criotubo donde estaba almacenada mediante la utilización de fórceps, se colocó la muestra inmediatamente en una caja petri y se retiró el criopreservador de las muestras, utilizando fórceps y bisturí. Posteriormente cada biopsia fue cortada en 2 porciones cada una de las porciones con un peso de entre 3-5 mg, una parte de la biopsia se utilizó para obtener RNA total y la otra para la obtención de extractos proteicos totales, estos dos procedimientos se realizaron a la par con el objetivo de no someter las biopsias a ciclos de congelación y descongelación.

Para obtener el RNA total de las biopsias de tejido mamario, cada muestra fue colocada en un tubo cónico estéril de 15 mL donde previamente se adiciono 1 ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para cada muestra de tejido, las biopsias fueron lisadas utilizando un homogenizador de tejidos (TissueRuptor, Quigen). El procedimiento fue realizado en hielo, con 3-5 impulsos de 10 segundos a velocidad máxima y descansos de 10 segundos, con el objetivo no sobrecalentar la muestra. El lisado fue recuperado en un microtubo cónico de 1.5 mL e incubado durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación total de proteínas. Posteriormente, se añadieron 200 µL de cloroformo por cada ml de trizol utilizado y se mezclaron por agitación vigorosa durante 15 segundos, posteriormente se incubó el microtubo durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,500 rpm por 25 min a 4°C. Después de la centrifugación, se genera una mezcla trifásica una fase inferior rosa formada por fenol-cloroformo, una interfase y en la parte superior una fase acuosa incolora que

es donde se contiene al RNA. Se recuperaron alrededor de 400-450 μ l de la fase superior mediante pipeteo evitando mezclar con las fases y se añadieron a un microtubo de 1.5mL posteriormente se adicionaron 500 μ l de isopropanol para precipitar el RNA y se incubó en hielo durante 20 minutos posteriormente se realizó una centrifugación a 12,500 rpm durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 75% y se resuspendió la pastilla, finalmente se realizó otra centrifugación a 12,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5-10 minutos. Una vez que se obtuvo la pastilla el RNA fue resuspendido en un volumen de 20 μ l de agua libre de nucleasas que previamente fue calentada a 55°C, el RNA obtenido fue dividido en 2 alícuotas y fue almacenado a -80°C hasta su análisis.

4. Cuantificación del RNA.

La cuantificación del RNA total fue realizada mediante espectrofotometría en un equipo nanodrop 2000 (Thermo scientific) a una longitud de onda 260 y 280 nm. Si el RNA tiene una relación de densidad óptica 260/280 mayor de 1.8 indica que el RNA se encuentra limpio de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del RNA. La fórmula usada para determinar la concentración de RNA total fue $\text{absorbancia (260nm)} \times \text{dilución} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$. Se utilizaron solo las muestras de RNA que poseían una relación 260/280 superior a 1.8.

5. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama.

5.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares

Las líneas celulares adherentes de cáncer de mama MCF-7 (ATCC: HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC: HTB 26), SKBR3 (ATCC: HTB-30), MDA-MB-453 (ATCC: HTB-131) se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gluta-MAX-I, bajo en glucosa y glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB Gibco, Life Technologies) 10% , penicilina y estreptomina. Las líneas celulares de cáncer de mama T47D (ATCC HTB-133) y ZR-75-1 (ATCC:CRL-1500) se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) GlutaMAX, bajo en glucosa y glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Gibco, Life Technologies), penicilina y estreptomina, Las células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) fueron cultivadas en medio M200/PRF suplementado con Large Vessel Endothelial Supplement (LVES) (Gibco, Life Technologies) todas las líneas celulares usadas se incubaron con aireación a 37°C y con una atmósfera de 5% CO₂.

5.2 Subcultivo de líneas celulares

Para el mantenimiento de líneas celulares, primero se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con Buffer fosfato salino (PBS) 1x a pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS 1x pH 7.0-EDTA 6.8 mM, luego se añadió 64 µL tripsina (Gibco) 0.25 % por cada 1.5 mL de PBS-EDTA; se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios e incubaron durante 5 min a 37°C. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina

se visualizaron en microscopio para observar si se despegaron las células y se dio un pequeño golpe a la caja para separar por completo las células. Posteriormente se agregó PBS 1x-BSA 1% y se mezcló por pipeteo sobre toda la superficie, se transfirieron las células despegadas a un tubo falcón de 15 ml y centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco y se distribuyeron en frascos nuevos y estériles con el medio de cultivo suplementado correspondiente.

5.3 Congelamiento de las líneas celulares

En general, por criotubo se emplearon aproximadamente 2×10^6 células que se procesaron de manera similar a cuando se realiza un subcultivo pero en lugar de resuspenderlas en 1 ml de medio fresco, se agregó 1 ml de medio de congelamiento (500 µl de SFB, 400 µl de medio de cultivo completo y 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich). A continuación se cerró herméticamente el criotubo y se colocó en a -20°C durante aproximadamente 30 min y posteriormente se almacenaron los criotubos a -80°C, hasta su uso.

5.4 Descongelamiento de las líneas celulares

Los criotubos son colocados en hielo durante 2 min posteriormente se limpiaron con benzal y rápidamente se colocaron en baño a 37°C hasta que se descongelara el medio. Una vez que el medio se descongeló, se pasó a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 4°C, posteriormente se descartó el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en el medio suplementado correspondiente el cual fue previamente atemperado a 37°C, distribuyéndose en frascos nuevos y estériles.

6. Lisis y extracción de RNA total a partir de líneas celulares.

Para la extracción de RNA total de líneas celulares, cultivadas en frascos de 25 cm², se esperó a que estas llegaran a un 80% de confluencia, una vez que paso esto, se despegaron las células adicionando al frasco 1.5 ml de PBS-EDTA pH 7.0 y 64 µl de tripsina 0.25 % (Gibco) y se incubaron durante 5 min a 37°C, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1,200 RPM a 4°C durante 5 minutos posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 ml de PBS pH 7.0 , se centrifugó nuevamente a 1,200 RPM a 4°C durante 5 minutos y se tiró el sobrenadante. A la pastilla de células obtenida se le agregó 1mL de TRIzol y se mezcló por pipeteo posteriormente se recuperó el lisado celular en un microtubo de 1.5 ml y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado y se mezcló por agitación vigorosa durante 15 segundos, posteriormente se incubó el microtubo durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,500 rpm por 25 min a 4°C. Después de la centrifugación, Se recuperaron alrededor de 400-450 µl de la fase acuosa superior mediante pipeteo evitando mezclar con las otra fases y se añadieron a un nuevo tubo cónico de 1.5mL posteriormente se adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA y se incubó en hielo durante 20 minutos posteriormente se realizó una centrifugación a 12,500 rpm durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 75% y se resuspendió la pastilla, finalmente se realizó otra centrifugación a 12,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante un lapso de 5-10 minutos. Una vez que se obtuvo la pastilla el RNA fue

resuspendido en un volumen de 20 μ l de agua libre de nucleasas que previamente fue calentada a 55°C el RNA obtenido fue dividido en 2 alícuotas cuantificado y almacenado a -80°C hasta su análisis Finalmente el RNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1%.

6.1 Análisis de integridad del RNA.

Para determinar la integridad de cada RNA obtenido este fue evaluado 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 posteriores análisis.

7. Análisis de la expresión del mir-204 mediante sondas taqman.

Para determinar la expresión del miRNA-204 obtenido de las biopsias de tejido tumoral, tejido normal y de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, BT20, MCF-7, SKBR3, MDA-MB-453, T47D y ZR-75-1 el primer paso que se realizó fue la síntesis de cDNA a partir de RNA total y la utilización sondas stem-loop RT (Applied Biosystems) específicas para cada miRNA analizado (miR-204 y el RNA pequeño nucleolar (RNU44). Se mezclaron en un micro tubo cónico 10 μ g de RNA total, 3 μ l de primers RT, 0.15 μ l de dNTPs con dTTP (100mM); 1.0 μ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ μ l); 1.5 μ l de buffer RT 10X; 0.19 μ l de inhibidor de RNasa (20 U/ μ l) y 4.16 μ l de H₂O libre de RNasa, para una

reacción total de 15 μ l. 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 ∞ . Una vez que finalizó la reacción de RT-PCR, se realizó la reacción de PCR en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqMan, para lo cual en una placa óptica de 96 pozos de mezclaron 1.33 μ l del producto de la reacción de RT, 10 μ l del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No 4 AmpErase UNG, 2X), 7.67 μ l de agua libre de RNAsas, y 1.0 μ l de la sonda PCR (específica para cada miRNA) por pozo para una reacción de 20 μ l total. Cada una de estas reacciones se realizó por triplicado.

La reacción se corrió en un equipo 7500 de Applied Biosystems, 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. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ($2^{-\Delta\Delta ct}$), usando como calibrador la expresión de los miRNAs en la muestra control (tejido normal o células scramble) y como normalizador la expresión del gen endógeno RNU44. Así mismo en algunos casos se analizó la expresión del miR-21 como control positivo de la reacción qRT-PCR.

8. Transfección del precursor del miR-204

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 fueron transfectadas con la molécula precursora del miR-204 (Applied biosystems, MC11116), o con una secuencia scramble denominada pre-miR-Neg-Ctrl

(Scramble) a una concentración de 30nM. Para esto, un día antes de la transfección, se sembraron 300,000 células MCF-7 y 250,000 células MDA-MB-231 por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente en un microtubo cónico de 1.5 ml se mezclaron de 100 μ l de medio OptiMem con 5 μ l del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) por cada pozo a transfectar, a la par en otro microtubo cónico de 1.5 ml se mezclaron de 100 μ l de medio OptiMem con 7.5 μ l del precursor pre-miR-204 o del Scramble a una concentración de 10 μ M y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se mezcló el contenido de cada microtubo en uno solo, y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (2.3 ml). Se agitó suavemente con movimientos circulares durante 1 min y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ hasta su análisis. La expresión relativa del miR-204 expresado fue evaluada a las 48 hrs post-transfección, mediante qRT-PCR con sondas TaqMan como se describió anteriormente, este ensayo se realizó por triplicado técnico y por triplicado experimental.

9. Hibridación de microarreglos de expresión génica.

Para determinar cuáles son los genes modulados por el miR-204, se transfectaron 250,000 células MDA-MB-231 con el pre-miR-204 o con el Scramble (30nM) se extrajo el RNA total, como se describió anteriormente. Este RNA total se cuantificó

y se determinó su integridad. Solo se usaron RNAs con una correlación 260/280 superior a 2.0 y un valor de RIN superior a 6.

9.1 Síntesis de cDNA a partir de RNA total de células transfectadas

Para la síntesis de cDNA se emplearon 10 µg de RNA total con las características que se describieron anteriormente; se utilizó el kit superscript Double-Stranded cDNA síntesis Kit (invitrogen) para la síntesis de cDNA para lo cual se mezclaron en un microtubo cónico de 0.2 ml 10 µg de RNA total, 1 µl de oligo dT, y agua libre de nucleasas cbp. 11 µl, la mezcla se calentó a 70°C durante 10 minutos en un termociclador, posteriormente se le dio un spin a cada microtubo y se incubó en hielo durante 5 min. Pasado el tiempo de incubación, se le agrego a cada tubo 4 µl de 5x first strand buffer, 2 µl de DTT (0.1M), 1 µl de dNTP Mix (10mM), la mezcla se agitó suavemente, se le dio un spin y se incubaron los microtubos a 42°C durante 2 minutos en termociclador, pasado este tiempo se adicionaron 2 µl de superscript II mezclando por pipeteo y se incubó a 42°C durante 1h en termociclador. Posteriormente se le dio un spin a cada tubo y se incubó en hielo por unos segundos y después se adicionaron a cada reacción 91 µl de agua libre de nucleasas, 30 µl de 5x Second Strand Buffer, 3 µl de dNTP Mix (10mM) 1 µl de DNA ligasa (10 U/ µl), 4 µl de DNA polimerasa I y 1 µl de RNAsa H se mezcló por pipeteo y se incubó a 16°C durante 2 horas. Pasado este tiempo se adiciono a cada reacción 2 µl de T4 DNA polimerasa (5 U/ µl) y se incubaron durante 5 minutos a 16°C. Finalmente se adicionaron 10 µl de EDTA (0.5M) y se almacenaron las reacciones a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras de colocaron en hielo hasta que se descongelaran se les dio un spin y

posteriormente se les adicionó 1 µl de RNAsa A (4mg/ml) la reacción se mezcló suavemente por pipeteo se les dio un spin y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. La reacción se transfirió a un microtubo cónico de 1.5 mL y se adicionaron 163 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico se mezcló en vortex y se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos, posteriormente se recuperó la fase superior acuosa y se le adicionaron 16 µl de acetato de amonio (7.5 M) y se mezcló por inversión, posteriormente se les dio un spin y se le adicionaron 7 µl de glicógeno (5mg/ml) y se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó a 12,000 g durante 3º min a 4°C. Posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante y las pastillas se lavaron 6-8 veces adicionando 500 µl de etanol al 80% y centrifugando a 12,000 g durante 5 min. Después de los lavados la pastilla se secó en un equipo SpeedVac 30 min a TA. La pastilla se rehidrató en 20 µl de agua libre de nucleasas previamente calentada a 50°C. Cada reacción se cuantifico en un equipo nanoDrop solo las reacciones que obtuvieron un valor de relación 260/280 mayor a 1.8 y una concentración superior a 100 ng/µl fueron utilizadas, así mismo 250 ng de cDNA fueron analizadas en un equipo Agilent Bioanalyzer aceptando solo las muestras que presentaran un tamaño promedio superior a 400 pares de bases, las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión fueron almacenadas a -20 durante toda la noche.

9.2 Marcaje del cDNA.

Para el marcaje del cDNA se utilizó el kit NimbleGen One-Color DNA Labeling Kit (Roche). Se mezcló 998.25 µl del Random Primers Buffer (vial 2) con 1.75 µl de β-mercaptoetanol. Por otra parte se mezclaron suavemente los Cy3-Random

Nanomers (vial 3) y se mezclaron con 924 μ l del Random Primers Buffer/ β -mercaptoetanol finalmente se realizaron alícuotas individuales de 40 μ l en microtubos de 0.2 ml y se almacenaron a -20°C protegidos de la luz.

En un microtubo de 0.2 ml se adicionaron 1 μ g de cDNA, 40 μ l de Cy3-Random nanomers diluidos y agua libre de nucleasas cbp 80 μ l y se incubaron las muestras a 98°C durante 10 minutos en termociclador, posteriormente se incubaron en hielo durante 10 minutos. En otro tubo se preparó el dNTP/Klenow master mix (Sigma-Aldrich) para ello en un microtubo cónico de 0.2 ml se mezclaron 10 μ l de dNTP Mix (10mM) con 8 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l de klenow frangment (3'-5'exo-, 50U/ μ l).

Se mezclaron 20 μ l de dNTP/Klenow master mix con 80 μ l de la primera reacción (cDNA desnaturalizado/Cy3 random nanomers), se mezcló por pipeteo se le dio un spin a cada reacción y se incubaron durante 2 h a 37°C protegidos de la luz. Pasado este tiempo se adicionaron 10 μ l de solución de EDTA (0.5M) y 11.5 μ l de NaCl (5M), la mezcla se agitó con vortex se le dio un spin y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml donde se adicionaron 110 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron durante 10 minutos en hielo protegidas de la luz, posteriormente se centrifugaron a 12,000 g por 20 minutos, se removi6 el sobrenadante y se debe observar una pastilla color rosa. La pastilla se lav6 2 veces con 500 μ l de etanol frio al 80% y posteriormente se sec6 la pastilla en SpeedVac durante 5 min a TA

Las muestras se almacenaron a -20°C durante toda la noche protegidas de la luz.

Al día siguiente las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de agua libre de nucleasas se agitaron por vortex hasta que se disolvió completamente la pastilla, posteriormente se les dio 1 spin. Todas las muestras fueron cuantificadas en un equipo nanodrop a 260 nm, con base en la concentración obtenida, se calculó la integración de Cy3 en el cDNA, se desecharon aquellas muestras que tuvieran una concentración de cDNA marcado con Cy3 menor a 4 µg. las muestras nuevamente fueron secadas en SpeedVac y almacenadas a -20°C durante toda la noche.

9.3 Hibridación de microarreglo Nimblegen 12x135k.

Para llevar a cabo la hibridación de los microarreglos NimbleGen Human Gene Expression 12x135K (Roche) primero se estabilizó el horno de hibridación a 45°C durante 3 horas. Por otra parte las muestras fueron resuspendidas 3.3 µl de simple tracking control (STC) 1 para las muestras de células tranfectadas con pre-miR-204 y 3.3 µl de STC 5 para las muestras de células transfectadas con el pre-miR-neg-Ctrl y se mezclaron por vortex. Posteriormente a cada muestra se le adicionó 8.7 µl de solución de hibridación (la cual fue preparada mezclando 88.5 µl de 2x Hybridation buffer, 35.4 µl de Hybridation component A y 3.6 µl de Alingnament Oligo.) se mezcló por vortex, se le dio un spin y se incubaron las reacciones durante 5 minutos a 95°C protegidas de la luz. Se montaron las laminillas en el PMAT junto con el mixer y se colocaron en el horno de hibridación a 42°C. Finalmente se cargaron 6 µl de muestra en cada uno de los arreglos (6/12) en la laminilla teniendo cuidado de no meter burbujas al arreglo.

Posteriormente se selló la laminilla mediante la utilización de un mixer multi-port seal cover. La hibridación se realizó durante 48 h a 42°C.

9.4 Escaneo y análisis de los microarreglos

Pasado el tiempo de hibridación se retiró el mixer de cada laminilla posteriormente estas fueron lavadas y secadas. Finalmente las laminillas fueron escaneadas en un equipo Nimblegen MS 200 Microarray Scanner (Roche) a una longitud de onda de 532 nm. Una vez que se escaneo el micro arreglo este fue analizado y normalizado utilizando los software Nimble Scan y Analysis of nimbleGen Arrays Interface Suite (ANAIS, (<http://anais.versailles.inra.fr/>)) respectivamente.

10. Validación de los microarreglos de expresión.

Con el fin de validar los resultados obtenidos en el microarreglo de expresión génica en células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204, se realizaron ensayos qRT-PCR con sondas específicas para 10 genes, 6 genes que fueron reprimidos en el micro arreglo y 4 que fueron sobreexpresados. Estos genes se seleccionaron considerando que se encontraban entre los que poseían los valores más altos y más bajos de fold change respectivamente. Para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos específicos mediante la utilización del programa primer blast tabla 4.

Como normalizador, se analizó la expresión del gen *gapdh* para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar dicho gen mediante qRT-PCR. Para la realización de la reacción de RT-PCR en tiempo real se utilizaron 2 µl de RNA total (500 ng/µl) de células transfectadas con el pre-miR-204 o con el

pre-miR-Neg-Ctrl, que se mezclaron con 1 µl de 10x RT buffer, 2.2 µl de MgCl₂ (25mM) 1 µl de Random primer (50 mM), 0.5 µl de inhibidor de RNAsas (20 U/L), 0.5 µl de enzima multiscribe II (50 U/ µl) y agua cbp 10 µl y se incubaron en termociclador 10 min 25°C, 30min a 48°C y 5 min a 95°C. posteriormente se realizó la reacción de PCR en tiempo real con SYBR green (Thermo Scientific) para esto se realizó la siguiente reacción por pozo en una placa de 96 pozos: 25 µl de 2x SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl de oligo sentido (10 µM) y 1 µl de oligo antisentido (10 µM) 1 µl de cDNA y agua libre de nucleasas cbp 50 µl. la reacción se corrió en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied biosystems) con el siguiente programa: incubación a 95°C durante 10 min, 40 ciclos (95°C 15 seg, 60°C 1 min). Para la interpretación de los resultados se utilizó el método comparativo de ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$), usando como calibrador la expresión de los genes en las muestra control (células tranfectadas con scramble) y como normalizador la expresión de *gapdh*.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la validación del microarreglo de expresión mediante qRT-PCR

Gen	Secuencia (5'→3')	Tamaño del producto (pb)	Posición (de/ a)
GAPDH	FW- CCCACCCACACTGAATCTCC RV- GTACATGACAAGGTGCGGCT	90	1266-1355
IPO5	FW- AGGAGAAATGCACGAGGCAA RV- TTAAGGCCCTTCACGCAGAG	173	3134-3306
RPS6	FW- TGTTACTCCACGTGTCCTGC RV- AAGTCTGCGTCTCTTCGCAA	166	579-744
TIMP2	FW- AGCTTTGCTTTATCCGGGCT RV- ATGCTTAGCTGGCGTCACAT	175	1868-2042
EGFR2	FW- GGTGGCATTAGGGGTGACT RV- CAAGGGAACAGGAAATATGTCTG	173	1365-1537
ESR1	FW- ACTCAACAGCGTGTCTCCG RV- CACATTTTCCCTGGTTCCTGTAG	173	529-701
CCND1	FW- GCTGTAGTGGGGTTCTAGGC RV- GGCACGCTACGCTACTGTAA	160	1626-1785
PRKAA1	FW- AGTGTCGCTTTTTGAATAGTTTG RV- AGCAGTCTAGGCCAACAAGC	243	661-903
EGR3	FW- GGTGACCATGAGCAGTTTGC RV- TAGGTCACGGTCTTGTTGCC	225	388-612
ESR1	FW- CGCTGCGTCGCCTCTAA RV- TCCAGCTCGTTCCCTTGAT	182	124-305
TCERG1L	FW- TACAGGTTTCCAAGGGTGCC RV- TGCAAACCTCCGGGCATACAA	162	2405-2528
CHRNA4	FW- AATGTCACCTCCATCCGCATC RV- GTCAGCATTGTTGTAGAGGG	72	550-598

11. Evaluación de la viabilidad celular por ensayos MTT.

Con el fin de evaluar el efecto de la expresión del miR-204, sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, transfectada con la molécula precursora pre-miR-204 a una concentración final 30, 50 y 100 nM se realizó un ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen). Para ello, 5 mg de MTT fueron solubilizados en 1 ml de medio sin complementar y fue filtrado por microfiltración y la solución se almaceno por no más de 15 días a 4°C. Por otro lado se sembraron 50,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 24 pozos y fueron transfectadas con el pre-miR-204 o con el premiR-Neg-Ctrl, como se describió anteriormente, 48 h después de la transfeccion las células fueron lavadas con PBS estéril y se adicionaron 500 µL de solución de MTT diluida a una concentración 0.5 mg/ml y se incubaron durante 3 h a 37°C en obscuridad, posteriormente se retiró la solución de MTT y se adicionaron 350 µL por pozo de solución solvente de MTT (3.3 ml de HCl y 10 µL de NP-40 disueltos en 9.9 ml de isopropanol). La placa fue cubierta con papel aluminio y se agitó durante 15 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm y 630 nm de referencia. Como blanco se utilizó solución solvente de MTT.

El valor de absorbancia de las células control fue tomado como el valor de viabilidad inicial expresado en porcentaje. Este ensayo se realizó por triplicado técnico y experimental.

12. Evaluación de proliferación celular por MTT.

Para determinar el efecto del miR-204 sobre la proliferación celular, se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 o MCF-7 por pozo en una placa de 6 pozos, y fueron transfectadas como se describió anteriormente con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl como control se utilizaron células tratadas únicamente con el agente transfectante. 24h después de la transfección las células fueron incubadas con medio sin complementar durante 24 h. después de estas 24 h se les agrego medio fresco complementado debidamente y fueron incubadas por 2-3 horas en condiciones normales. Se determinó la reducción del MTT como se indicó anteriormente 3 horas, (tomando esto como tiempo 0), 24, 48 y 96 h después de adicionarles el medio complementado. Los resultados se reportaron como proliferación celular tomando como 1 el tiempo 0. Este ensayo se realizó por triplicado técnico y experimental.

13. Evaluación de proliferación celular mediante ensayo clonogenico *in vitro*

Para determinar la proliferación mediante ensayo clonogenico, se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 o MCF-7 por pozo en una placa de 6 pozos, y fueron transfectadas como se describió anteriormente con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl, como control se utilizaron células tratadas únicamente con el agente transfectante. 48 h después de la transfección, las células fueron despegadas con tripsina 0.25%/PBS-EDTA y se sembraron 1000 células por pozo en una placa de 6 pozos, teniendo especial cuidado en distribuir las células de manera homogénea en toda la superficie del pozo evitando la formación de conglomerados a en las

orillas. Las células se incubaron en condiciones normales durante 14 días. Pasado éste tiempo se retiró el medio, las colonias fueron fijadas con Metanol/Ácido acético 7:1 y fueron teñidas con cristal violeta al 1%. Se realizó el conteo de colonias en microscopio óptico tomando en cuenta solo las colonias formadas con al menos 50 células las cuales se consideraron como sobrevivientes clonogénicos. Los datos se reportaron como numero de colonias formadas.

14. Determinación de la migración celular mediante ensayo de “cicatrización de herida” (Wound-Healing)

Con el objetivo de evaluar el efecto del pre-miR-204 sobre la migración celular en células MCF-7 y MDA-MB-231. Se sembraron 350,000 células MDA-MB-231 o MCF-7 sobre laminillas estériles por pozo en una placa de 6 pozos, y fueron transfectadas como se describió anteriormente con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl, 48 horas después de la transfección y con la condición de que las células hubieran formado una monocapa cerrada sobre las laminillas, se realizaron 4 heridas cruzadas de alrededor 100 μ usando una punta de 10 μ L estéril. Posteriormente a la realización de las heridas las laminillas fueron lavadas con PBS estéril. 2 laminillas (pre-miR-204/Scramble) fueron fijadas inmediatamente con paraformaldeido al 4% durante 45 min y montadas sobre portaobjetos empleando como medio de montaje una solución PBS/glicerol (1:1) estas se consideraron como tiempo 0 esto se repitió a las 12 y 24 h después de que se realizó la herida en la monocapa. Cada laminilla fue fotografiada mediante la utilización de microscopio óptico. Los resultados se reportaron como % de

cicatrización de la herida a través del análisis de la reducción del área de la herida, tomando como 100% el área de la herida documentada en el tiempo 0 o como porcentaje de células migrantes mediante el conteo de las células que migraron hacia la herida, respectivamente. Este ensayo se realizó por triplicado técnico y experimental.

15. Ensayo de invasión celular en cámaras transwell.

Para evaluar la invasión celular se empleó un método que consiste en el uso de cámaras transwell (Corning, poro 0.8 micras). Para lo cual se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 o MCF-7 por pozo en una placa de 6 pozos, y fueron transfectadas como se describió anteriormente con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl. 48 horas después de la transfección las células fueron despegadas con tripsina 0.25%/PBS-EDTA. Un día antes de la preparación de las cámaras transwell, se incubaron a 4°C durante toda la noche las cámaras transwell, puntas tubos conicos de 1.5 ml estériles, PBS pH 7 estéril, y el matrigel 5X. Al siguiente día 500 µL de matrigel 5x (Basement Membrane Matrix - BD Biosciences) fueron diluidos en 2 ml de pbs frio, estéril, pH7.0 con movimientos lentos, incubando en hielo, se adicionaron 300 µL de matrigel 1x en el compartimento superior de cada cámara transwell y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después de la incubación se agregó 800 µl de medio complementado y atemperado en el compartimento inferior de la cámara transwell y 300 µl de medio sin complementar en la parte superior (donde está la capa de matrigel) y se sembraron 100,000 células en la parte superior de la cámara transwell. 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 consideró como referencia la cantidad de células que migran en la condición control (scramble). Dicho conteo se realizó de forma manual.

16. Determinación de la expresión de las proteínas ANGPT1, CREB5 y TGFBR2 en líneas celulares de CM y en biopsias de tejido normal y tumoral

16.1 Obtención de extractos proteicos totales.

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de las líneas celulares de cáncer de mama, se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS 1x frío, luego se incubaron con 960 µl de buffer de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) suplementado con 40 µl de cóctel de inhibidores de serínproteasas, cisteínproteasas y metaloproteasas 15X (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a 4°C durante 15 min en agitación. De manera alternativa, se pueden despegar las células de los frascos de cultivo celular con tripsina 0.25%/PBS-EDTA como se describió anteriormente hasta obtener una pastilla de células, la cual se lava 1 vez con PBS frío, y se resuspende en el buffer de lisis TNTE frío y suplementado, este procedimiento permite un mayor rendimiento en la obtención de extractos proteicos totales. Posteriormente, se centrifugó la suspensión de células-buffer a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su cuantificación y análisis. Para la obtención de extractos proteicos a partir de biopsias de tejido tumoral/normal, mediante la utilización de fórceps se sacó cada

biopsia del criorubo donde estaba contenida y embebida en un agente criopreservador, esto se hizo de manera independiente para cada biopsia, las muestras fueron colocadas en una caja petri estéril donde se retiró el agente criopreservador (Tissue-Tek) mediante la utilización de fórceps y bisturí una vez hecho esto, cada biopsia fue dividida en 2 partes, una para la obtención de RNA total y otra para la obtención de Extractos proteicos totales lo cual se hizo de manera simultánea. Cada muestra fue colocada en un tubo cónico estéril de 15 ml donde previamente se adicionaron 500 μ L de buffer TNTE frío suplementado con inhibidor de proteasas “complete” (Roche), posteriormente las cada biopsia fue lisada de manera independiente utilizando un homogenizador de tejidos (TissueRuptor, QIAGEN). El procedimiento fue realizado en hielo, con 3-5 impulsos de 10 segundos a velocidad máxima y descansos de 10 segundos, con el objetivo de no sobrecalentar la muestra. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 4°C durante 15 min en agitación, finalmente las muestras se centrifugaron a 12,500 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su cuantificación y análisis.

16.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos totales, se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1 mg/ml). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta elaborada a

partir de los valores de la curva estándar. La ecuación es: $y = m x + b$, donde y es la absorbancia 595 nm, m es la pendiente, x es la concentración de proteínas y b es la ordenada al origen.

16.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó a una concentración de acrilamida del 10% ó 12% en el gel separador y al 5% en el gel concentrador. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

16.4. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Los geles, las membranas, papeles whatman y esponjas se incubaron 15 min en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y, 20 % de metanol). Posteriormente, se armó el cassette, se sumergió en la solución de transferencia y se transfirió a 400 mA durante 1 h en hielo ó a 40 mA durante toda la noche a 4°C. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceau, posteriormente se lavó la membrana con PBS 1x pH 7.4.

16.5 Ensayos de inmunodetección

Las membranas donde fueron transferidas las proteínas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4) durante 1 h a TA ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween20 (Bio-Rad) (0.05%) durante 5 min, tres veces, y posteriormente se agregó el anticuerpo primario diluido (Tabla 5) en PBS 1x-Tween20 0.05%, y se incubó durante 1 h a TA ó toda la noche a 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x-Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido (Tabla 5) en PBS 1x-tween 20 al 0.05% y se incubó durante 1 h a TA en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron cinco veces durante 3 min con PBS 1x y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amhersham Pharmacia Biotech, USA). Posteriormente cada membrana fue leída en un equipo ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad). A las bandas detectadas en las membranas se les realizó un análisis densitometrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Scientific).

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección.

Anticuerpo primario	Marca (Num cat)	Dilución	Secundario	Marca (Num cat)	Dilución
Anti-ANGPT-1	Abcam (Ab8451)	1:1000	Anti-Rabbit- HRP	Invitrogen (G21234)	1:2,500
Anti-TGFBR-2	Abcam (Ab61213)	1:1000	Anti-Rabbit- HRP	Invitrogen (G21234)	1:2,500
Anti-CREB5	Abcam (Ab168928)	1:1000	Anti-Rabbit- HRP	Invitrogen (G21234)	1:2,500
GAPDH	Cell signaling (2125s)	1:2000	Anti-Rabbit- HRP	Invitrogen (G21234)	1:2,500

17. Análisis bioinformáticos.

Para la predicción in silico de los blancos del miR-204 se utilizaron los programas TargetScan versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), PICTAR (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi) y Diana-microT versión 4.0 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microtv4/index>).

Cada programa fue utilizado con los parámetros que los programas generan por defecto. De cada lista obtenida en los diferentes programas, se tomaron solo aquellos blancos predichos que eran comunes en al menos 2 de 3 bases de datos. Posteriormente se analizó cuáles de estos posibles blancos predichos coincidían con los genes modulados obtenidos del micro arreglo de expresión. Para realizar el análisis de enriquecimiento y ontología con las listas de blancos predichos del miR-204, así como genes modulados en el microarreglo de expresión, se utilizó la base DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Para ello el nombre de los genes obtenidos tanto en el microarreglo como en las bases de datos fueron homogeneizadas transformándolas a Oficial Gene Symbol, mediante la utilización del software SOURCE (<http://puma.princeton.edu/cgi-bin/source/sourceResult>). El análisis en DAVID fue realizado con el identificador GENE SYMBOL, seleccionando en 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.

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.

Por otra parte se realizó una búsqueda de datos reportados en pacientes donde se analizó la expresión del miRNA así como la expresión de TGBFR2 y ANGPT1 en cáncer de mama mediante la utilización del software del TCGA Cancer Regulome tool. (<http://explorer.cancerregulome.org/>) finalmente los datos de expresión cada paciente fueron descargados del TCGA Download Matrix (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>).

18. Construcciones plásmidos pmiR-LUC-3'UTR.

18.1. Amplificación de las secuencias 3'UTR de los genes *creb5*, *mapre 2*, *angpt1*, *tgfbr2* y *smad4*

La elección de los genes candidato se realizó mediante el análisis y correlación entre los datos arrojados por la predicción de mRNAs blanco y aquellos resultantes del microarreglo de expresión.

Se diseñaron un par de oligonucleotidos específicos para amplificar mediante PCR un fragmento de la 3'UTR de los genes, *creb5* (NM_001011666.1), *mapre 2* (BC007318.2), *angpt1* (NM_001146.3), *tgfr2* (NM_001024847.2) y *smad4* (NM_005359.5). De manera inicial se extrajo DNA total a partir de sangre de 2 donadores sanos, mediante la utilización del kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) el DNA total obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría, se alicuyó y se almaceno a -80°C hasta su uso. Se realizó la PCR empleando 100 ng de DNA genómico. La mezcla de reacción consistió en buffer de PCR 1x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen), dNTPs 10 mM 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), agua, 1 µl de cada oligonucleótido (10 µM). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C/ 5 min, luego 35 ciclos de 94°C/30 seg, 61°C/30 seg y 72°C/30 seg y el paso de extensión final de 72°C/7 min y un paso final de 4°C. Posteriormente se analizaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed 1x(Biotium) y se visualizó en un transiluminador de luz UV .

18.2 Hibridación y clonación de las secuencias 3'UTR mutadas

Se diseñaron 2 pares de oligonucleotidos correspondientes a un fragmento de 67 pb de las 3'UTR de los genes *angpt1* y *tgfr2* en los cuales se les introdujo cambios en 3 bases las cuales forman partela región semilla o sitio de unión al mir-204 (tabla 7) los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración de 1µg/ml y se hibridaron a 98°C durante 5 min y 1h a 37°C posteriormente, el dúplex (sentido/antisentido) se diluyó a una concentración final de 8 ng/µl (5 µl del inserto

en 45 µl de agua libre de nucleasas). Se comprobó la hibridación de los oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed 1x (Biotium) y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Observándose en los oligonucleótidos hibridados un retardamiento en el corrimiento electroforético esto al comparar con los oligonucleótidos no hibridados.

18.3 Ligación de los insertos 3'UTR dentro del plasmido pmiR-report-Luc

Para el caso de los fragmentos de las 3'UTR que se obtuvieron a partir de amplificación por PCR (como se describió anteriormente) estos fueron cuantificados y posteriormente 2 µg de cada amplificado fue restringido con las enzimas *SpeI* y *HindIII* (New England BioLabs) a 37°C durante toda la noche, posteriormente los fragmentos se corrieron en gel de agarosa al 2% se verificó el tamaño y se purificó a partir de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) los fragmentos purificados se diluyeron hasta una concentración final de 10 ng/µl. Para el caso de los oligonucleótidos hibridados estos insertos fueron diluidos a una concentración final de 8 ng/µl. de igual manera el vector fue restringido con las enzimas *SpeI* y *HindIII*, se corrió en un gel de agarosa al 1% se verificó el tamaño y se purificó a partir de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) el vector plasmídico se diluyó a una concentración de 100 ng/ µl. Las reacciones de ligación se prepararon utilizando 100 ng de plásmido restringido y purificado, se montaron 4 reacciones de ligación para cada inserto (relación molar vector: inserto) 1:1, 1:3, 1:6 y 1:0.

Las reacciones de ligación se prepararon a un volumen final de 10 μ l (x μ l del inserto diluido, agua libre de nucleasas c.b.p. 10 μ l, 1 μ l de buffer de ligasa T4 10x, 1 μ l (100 ng) del vector pmiR-repor-Luc (Applied Biosystems) y 1 μ l de T4 DNA ligasa (5 U/ μ l). Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1 μ l de solución de hibridación de DNA 1x). Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon para transformar células *E. coli* DH5 α competentes. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas por lisis alcalina, posteriormente se secuenciaron.

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para amplificar la 3' UTR de los genes *creb5*, *mapre 2*, *angpt1*, *tgfr2* y *smad 4*.

Gen	Secuencia	Amplicon bp
<i>creb5.1</i>	Forward primer 5'GGACTAGTTCTTCAAAGACTGGCTTTCATTTT 3' Reverse primer 5'CCCAAGCTTAAAGCACCAAAGCGTTTCCC 3'	225
<i>mapre 2.1</i>	Forward Primer 5'GGACTAGTTGCAAGTCTAACCTCTGAACA 3' Reverse primer 5'CCCAAGCTTATGTTTTCCCCCACGACACA 3'	201
<i>angpt1.1</i>	Forward primer 5'GGACTAGTCGTGAATCTGGAGCCGTTTG 3' Reverse primer 5'CCCAAGCTTAGTAGTTTGAAGCACAGCAAGC 3'	141
<i>tgfr2.1</i>	Forward primer 5'GGACTAGTTGTCAGAGGATACTGTGGCTTG 3' Reverse primer 5'CCCAAGCTTTGAGTACAGCTGAAGTGTTCCA T 3'	162
<i>smad4.1</i>	Forward primer GGACTAGTACACCCACCGTAAGACCTCA Reverse primer CCCAAGCTTTCTTTGTATACCAGGGGCGG	156

Tabla 7. Oligonucleótidos complementarios correspondientes a fragmentos de la 3'UTR de los genes *angpt1* y *tgfr2*.

Oligonucleótidos	Secuencia
Sentido ANGT1 MT	5' AATGCACTAGTACGTGGCTCGACTATAGAAAACCTCCACTG ACTGTCGGGCTTTATATAGCGTAGAAGCTTAATGC 3'
Antisentido ANGT1 MT	5' GCATTAAGCTTCTACGCTATATAAAGCCCGACAGTCAGTG GAGTTTTCTATAGTCGAGCCACGTACTAGTGCATT 3'
Sentido TGFR2.1MT	5' AATGCACTAGTATTCTGTAGTTCCTAAAATACTGACT TTTTTCACTACTATACATATACGAGAAAAGCTTAATGC 3'
Antisentido TGFR2.1MT	5' GCATTAAGCTTTTCTCGTATATGTATAGTAGTGAAAAAAGT CAGTATTTTGTAGGAACACAGAATACTAGTGCATT 3'

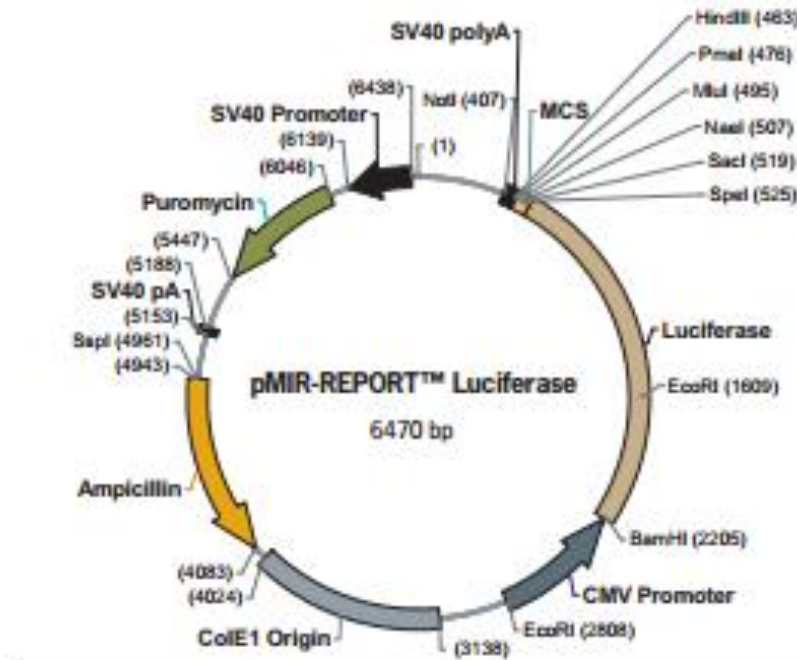


Figure 1. pMIR-REPORT Luciferase

CMV Promoter: 2210–2813	Puromycin: 5447–6046
Firefly luciferase: 540–2210	SV40 pA signal: 5153–5188
MCS: 467–539	Ampicillin: 4083–4943
SV40 Poly(A): 404–467	ColE1 Origin: 3138–4024
SV40 Promoter: 6139–6438	

Figura 8. Mapa del vector plasmidico pmiR-report. Los insertos correspondientes a las 3'UTR de los genes *angpt1*, *creb5* y *tgfb2* fueron ligados en el plásmido pmiR-report entre los sitios de restricción *SpeI* y *HindIII*.

19. Validación de blancos mediante construcciones LUC-3'UTR.

19.1 Transfección de las construcciones pmiR-LUC-ANGPT1, pmiR-LUC-TGF β R2, pmiR-LUC-CREB.1, pmiR-ANGPT1.MUT y pmiR-TGFBR1-MUT en células MDA-MB-231.

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pmiR-report-LUC. Se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas mediante lipofección en condiciones de esterilidad como sigue: (Reacción de transfección para un pozo) en un microtubo de 1.5 ml se colocaron 5 μ g de la construcción pmiR-LUC-ANGPT1 o pmiR-LUC-TGF β R2 o pmiR-LUC-CREB.1 o pmiR-ANGPT1.MUT o pmiR-TGFBR1-MUT y se mezclaron con 150 μ l de OptiMEM, por otro lado en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 9 μ l de lipofectamina 2000 reagent (INVITROGEN) y se mezcló con 150 μ l de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Pasado el tiempo de incubación se mezcló el contenido de ambos tubos en uno solo por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 minutos a TA para permitir la formación de los complejos Lipofectamina-DNA. Durante el tiempo de incubación se le retiró el medio a las células y se lavaron 2 veces con PBS pH7.0, posteriormente se les adicionó 1.8 ml de medio DMEM sin complementar; Pasado el tiempo de incubación se le adicionaron los complejos lipofectamina-DNA (200 μ l) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 horas en condiciones normales.

Posteriormente se retiró el medio sin complementar de los pozos con células y se les adicionó 2000 μ l de medio de cultivo DMEM debidamente complementado, finalmente las células se incubaron en condiciones normales durante 24h. Como normalizador se utilizó el plásmido pMIR-REPORT β -gal.

19.2 Co-transfeccion del pre-miR-204 y pre-miR-Neg-Ctrl en células transfectadas con las construcciones pmiR-LUC-3'UTR.

Una vez que las células tumorales fueron transfectadas con las construcciones pmiR-3'UTR (24 h después) estas fueron co-transfectadas con el pre-miR-204 o el premiR-Neg-Ctrl o solo agente de transfección. para ello en un microtubo cónico de 1.5 ml se mezclaron de 100 μ l de medio reducido Opti-Mem con 5 μ l del agente de transfección siPORT™ Amine (Applied Biosystems) por cada pozo a transfectar, a la par en otro microtubo de 1.5 ml se mezclaron de 100 μ l de medio reducido Opti-Mem con 7.5 μ l del precursor pre-miR-204 o Scramble a una concentración de 10 μ M y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se mezcló el contenido de cada microtubo en uno solo, y se homogenizó por pipeteo, se le dio un spin y se incubó durante 10 minutos más a temperatura ambiente, posteriormente esta mezcla se depositó en cada pozo junto con medio DMEM debidamente complementado (2.3 ml).la placa se agitó suavemente con movimientos circulares durante 1 min y posteriormente se incubó durante 24h a 37°C y 5% de CO₂.

19.3 Detección de la actividad luciferasa.

Para la determinación de la actividad luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (promega) para ello primero se diluyó el buffer de lisis 5x (CCLR) en agua a temperatura ambiente (TA), las células se lavaron con PBS pH7.0 se les adiciono posteriormente 150 µl de buffer de lisis 1x las células se mantuvieron en agitación durante 5 minutos en hielo, posteriormente se transfirió el lisado de células a un microtubo cónico de 1.5 ml y se agitó con vortex 3 veces 10-15 segundos finalmente el lisado celular se centrifugo durante 2 minutos a 12,000 g a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo cónico ambar a 4°C, en una placa de 96 pozos de fondo opaco se colocaron 100 µl de Luciferase Assay Reagent II y 20 µl de lisado celular y se mezcló por pipeteo, la lectura de la placa se realizó en equipo un luminómetro Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo Scientific) con 2 segundos de retardamiento antes de cada lectura seguida de lecturas de 10 segundos para cada pozo. Los resultados se reportaron como actividad de luciferasa relativa. Este ensayo se realizó por triplicado técnico y experimental.

20. Ensayos de angiogénesis.

20.1 Ensayo de formación de túbulos *in vitro*.

Para determinar el efecto del miR-204 sobre la inducción de angiogénesis en células de cáncer de mama, se empleó el kit In vitro Angiogenesis Assay (CHEMICON). Para ello 200,000 células MDA-MB-231 y 250,000 células MCF-7 fueron transfectadas con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl como se describió anteriormente un día antes de realizar el ensayo de angiogénesis, la matriz

extracelular o BME se incubó en hielo y en refrigeración a 4°C toda la noche, así mismo las placas de 96 pozos, los microtubos y las puntas empleadas fueron incubadas a 4° un día antes. es importante hacer notar que el matrigel o BME debe trabajarse a una temperatura menor a 10°C para evitar que se polimerice. Se mezclaron 900 µl matriz extracelular con 100 µl EC-Matrix buffer diluent frío, la mezcla se homogeneizó lentamente por pipeteo en hielo evitando la formación de burbujas. Se distribuyeron 50 µl de matrigel diluida por pozo en una placa de 96 pozos fría evitando la formación de burbujas en los pozos. La placa se incubó 1 h a 37°C, pasado este tiempo se inocularon 10,000 células MDA-MB-231 o MCF-7 transfectadas con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl o tratadas con el agente transfectante, y se incubaron en medio DMEM sin complementar durante 24 h a 37°C. pasado este tiempo se inocularon 10,000 células HUVEC en los mismos pozos donde se sembraron el día anterior las células tumorales, como controles se sembraron células en monocultivo, MDA-MB-231 o MCF-7 o HUVEC así mismo células MDA-MB-231 o MCF-7 HUVEC sembradas en monocultivo fueron tratadas con VEGFA a una concentración de 10 ng/ml (control positivo de formación de túbulos) y se incubaron a 37°C durante 24h. Las imágenes se documentaron a las 24 h posterior a que se sembraron las células HUVEC. Realizando el conteo de los túbulos formados, así como los puntos de ramificación.

20.2 Ensayo directo de angiogénesis *in vivo* (DIVAA).

Para determinar el efecto del miR-204 en las células MDA-MB-231 sobre la inducción de angiogénesis *in vivo* se empleo el kit Direct *In Vivo* Angiogenesis Assay (DIVAA, Trevigen). Para ello 200,000 células MDA-MB-231 fueron

transfectadas con el pre-miR-204 o pre-miR-Neg-Ctrl, como se describió anteriormente, El basement membrane extract (BME) se incubo en hielo y en refrigeración a 4 °C una noche antes, así mismo las puntas y los angioreactores fueron incubados a 4°C.48 h después de la transfección, 100 µl de BME fueron mezclados con 6 µl de FGF-2(1.8 µg/ml) /VEGF(600 ng/ml), se homogenizó la mezcla por pipeteo evitando la formación de burbujas y se distribuyeron 20 µl de la mezcla por angioreactor en 5 angioreactores (control positivo) de igual manera 100 µl de BME se mezclaron 6 µl de DMEM, la mezcla se distribuyo en 5 angioreactores, 20 µl por angioreactor (control negativo) finalmente 40,000 células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-Neg-Ctrl o pre-miR-204 fueron disueltas en 8 µl de medio DMEM sin complementar y mezcladas con 100 µl de BME para cada condición y se distribuyeron 20 µl por cada reactor (5 con pre-miR-204 y 5 con Scramble). Después de que fueron llenados todos los angioreactores estos se colocaron de manera individual boca abajo en microtubos cónicos estériles de 1.5 ml e incubados durante 1 h a 37°C, posteriormente fueron implantados en ratones desnudos hembras de 8 semanas de edad, para ello cada ratón fue sedado con 100 mg/ml Ketamina HCL y 20 mg/ml Xilazina, se implantaron 2 angioreactores en cada ratón de manera subcutánea en la región dorsal trasera. 9 días después de la implantación los ratones fueron sacrificados y se retiraron los angioreactores, cada angioreactor fue fotografiado y posteriormente se extrajo el BME de cada angioreactor, se marco con FITC-Lectina y se determino la formación de vasos mediante fluorometria en un equipo Ascent Microplate Fluorometer (Thermo Scientific).

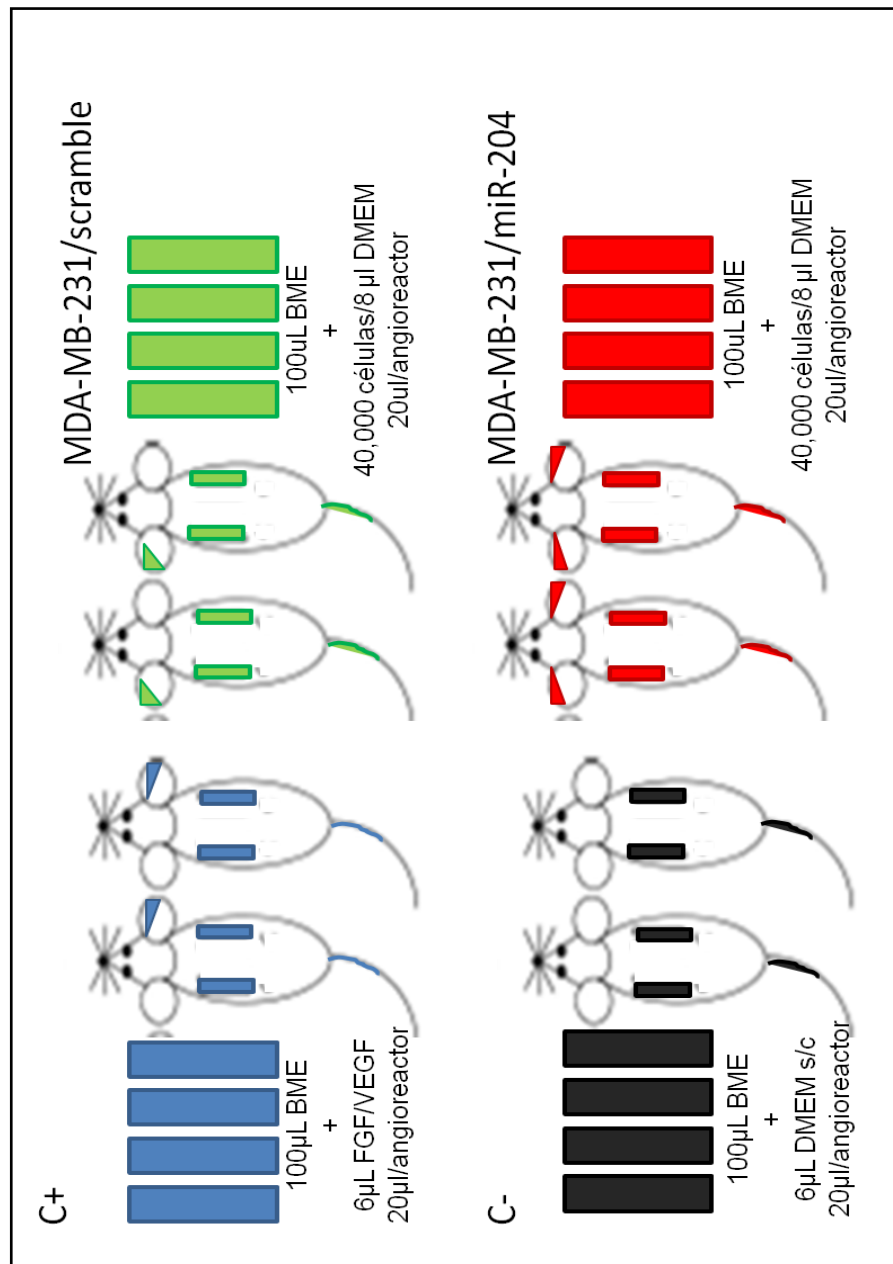


Figura 9. Ensayo de angiogénesis *in vivo*. Para la realización del ensayo de angiogénesis *in vivo* se emplearon ratones desnudos nu/nu en los cuales se les implantaron 2 angiorectores uno en cada flanco, se midió la angiogénesis 9 días después.

21. Silenciamiento de los genes *angpt1* y *tgfbr2*

21.1 Silenciamiento de la expresión de los genes *angpt1* y *tgfbr1* mediante interferencia del RNA

Para el silenciamiento del gen *angpt1* y *tgfbr1* se utilizó un método basado en una construcción plasmídica que expresa el transcrito de interés que forma una estructura de horquilla (short hairpin RNA), conocida como shRNA. El shRNA es procesado por la célula y tiene como blanco un RNAm que es degradado a través del proceso celular denominado interferencia del RNA (RNAi). Usando estos vectores de expresión de siRNA se puede reducir la expresión de genes blanco.

21.2 Elección e hibridación de las secuencias blanco.

Se seleccionaron 2 secuencias blanco ubicadas en diferentes regiones de cada gen se diseñaron 4 secuencias dirigidas contra distintas regiones de ambos genes. Una vez diseñados los oligonucleótidos para formar el inserto se clonaron en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion). Se hibridaron volúmenes iguales (2 µl) de cada uno de los oligonucleótidos, sentido y antisentido, (1 µg /µl) en solución de hibridación. Se incubará a 90°C durante 3 min para evitar que los oligonucleótidos no se plegaran sobre sí mismos y posteriormente a 37°C durante 1 h. Se prepararon alícuotas de oligonucleótidos hibridados a una concentración de 8 ng /ml y se almacenaron a -20°C hasta la ligación.

21.3 Ligación de los insertos siRNA dentro de pSilencer 5.1 U6 Retro

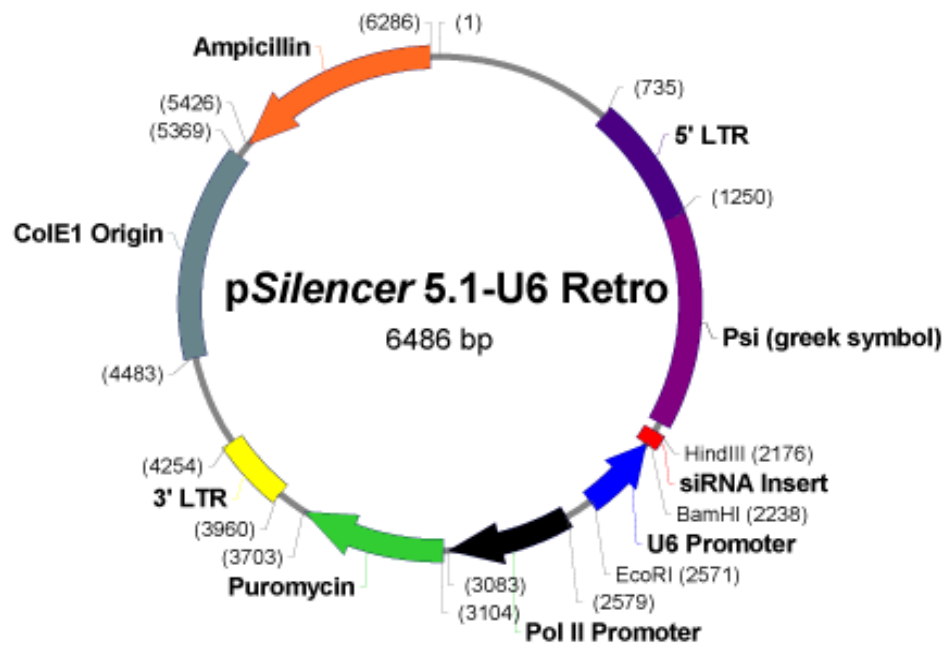
Para realizar la ligación el inserto generado al hibridar los oligonucleótidos sentido y antisentido se diluyó a una concentración final de 8 ng/μl (5 μl del inserto en 45 μl de agua libre de nucleasas). Posteriormente se preparó la reacción de ligación (1 μl del inserto siRNA diluido, 6 μl de agua libre de nucleasas, 1 μl de buffer de ligasa T4 10x, 1 μl del vector pSilencer 5.1 Retro y 1 μl de T4 DNA ligasa (5 U/μl). Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1 μl de solución de hibridación de DNA 1x). Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación son empleados para transformar células *E. coli* DH5α competentes obteniendo así las construcciones psilencer-ANGPT1.1, psilencer-ANGPT1.2, psilencer-TGFBR1.1 y psilencer-TGFBR1.2.

21.4 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α

Para realizar la transformación se descongelaron en hielo alícuotas de células competentes *E. coli* DH5α y luego se añadió la mezcla de ligación mezclando suavemente. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min a 37°C, luego se dio un choque térmico a 42°C durante 90 seg y se volvió a incubar en hielo durante 3 min. A continuación se añadieron 200 μl de medio Luria sin ampicilina e incubo a 37°C durante 45 min a 225 rpm. Finalmente se crecieron las bacterias transformadas en una placa con medio Luria-agar con ampicilina a 37°C durante toda la noche.

21.5 Extracción de plásmido por lisis alcalina (Miniprep)

Para propagar las clonas se eligió de 10-20 colonias aisladas y se inocularon en alícuotas de 3 ml de medio Luria con 100 µg de ampicilina. Se incubaron a 37°C en agitación durante 16 h. Luego, se tomaron 1.5 ml y se sedimentaron las células por centrifugación a 8000 rpm durante 3 min y se retiró el sobrenadante. A la pastilla se le extrajo el plásmido por lisis alcalina. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución I fría [(glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM)] y se agitó fuertemente en vórtex. Después se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min para lisar las bacterias. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M, pH 5.2), se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 xg durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y se centrifugaron a 12,000 xg durante 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes y las pastillas (ADN plasmídico y ARN) se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 a 15 min. Los ADN se resuspendió en 50 µl de agua estéril y el ARN se degradó mediante incubación con 1 µl de RNasa A (10 mg/ml) durante 30 min a 37°C.



U6 Promoter 2245-2578
 siRNA Insert 2181-2244
 Pol II Promoter 2579-3083
 Puromycin 3104-3703
 ColE1 Origin 4483-5369
 Ampicillin 5426-6286
 5' LTR 735-1250
 3' LTR 3960-4254
 Psi (greek symbol) 1251-2140

Figura 10. Mapa del vector plasmidico p-Silencer U6 Retro. Mapa y características del vector plasmidico utilizado para silenciar los genes *angpt1* y *tgfbr1* los oligonucleotidos complementarios para ambos genes fueron clonados entre los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *BamHI*.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para silenciar a los genes *angpt1* y *tgfb1*.

Oligonucleóti do	Secuencia 5'-3'	Posicion en el gen
ANGPT1.1-S	GATCCGGATTTCAGAAGCCTAATTCCTTCAAGAG AGGAATTAGGCTTCTGAAATCCTTTTTT GGAAA	2533-2554
ANGPT1.1-AS	AGCTTTTCCAAAAAAGGATTTCAGAAGCCTAATTC CTCTCTTGAAGGAATTAGGCTTCTGAAATCCG	2533-2554
ANGPT1.2-S	GATCCGCCATAATGAACTGTAGTACATTCAAGAG A TGTACTACAGTTCATTATGGCTTTTTTGGAAA	2617-2638
ANGPT1.2-AS	AGCTTTTCCAAAAAAGCCATAATGAACTGTAGTAC ATCTCTTGAATGTACTACAGTTCATTATGGCG	2617-2638
TGFBR2.1-S	GATCC GGAGGAGAAGATTCCTGAAGA TTCAAGAGA TCTTCAGGAATCTTCTCCTCC TTTT TT GGAAA	2041-2062
TGFBR2.1-AS	AGCTTTTCCAAAAAAGGAGGAGAAGATTCCTGAA GATCTCTTGAATCTTCAGGAATCTTCTCCTCCG	2041-2062
TGFBR2.2 S	GATCCGGTGTTAAGATTTGAAGTTGGTTCAAGAG ACCAACTTCAAATCTTAACACCTTTTTTGGAAA	3566-3587
TGFBR2.2 AS	AGCTTTTCCAAAAAAGGTGTTAAGATTTGAAGTTG GTCTCTTGAACCAACTTCAAATCTTAACACCG	3566-3587

21.6 Silenciamiento de los genes *angpt1* y *tgfb1* en la línea celular MDA-MB-231.

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones psilencer-ANGPT1.1, psilencer-ANGPT1.2, psilencer-TGFBR1.1 y psilencer-TGFBR1.2 fueron transfectadas mediante lipofección en células MDA-MB.231, para ello, se sembraron 200,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente las células fueron transfectadas como sigue: (Reacción de transfección para un pozo), en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 5 µg de las construcción psilencer-ANGPT1.1 o psilencer-ANGPT1.2 o psilencer-TGFBR1.1 o psilencer-TGFBR1.2 y se mezclaron con 150 µl de OptiMEM, por otro lado en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 9 µl de lipofectamina 2000 reagent (invitrogen) y se mezcló con 150 µl de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Pasado el tiempo de incubación se mezcló el contenido de ambos tubos en uno solo por pipeteo, se le dio un spin y se incubó por 10 minutos a TA para permitir la formación de los complejos Lipofectamina-DNA. Las células y se lavaron 2 veces con PBS pH7.0, posteriormente se les adicionó 1.8 ml de medio DMEM sin complementar; Pasado el tiempo de incubación se les adicionaron los complejos lipofectamina-DNA (200 µl) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 horas en condiciones

normales. Pasado el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se les adicionó 2000 µl de DMEM debidamente complementado, las células se incubaron en condiciones normales durante 48 h. El silenciamiento de los genes *angpt1* y *tgfbr1* se confirmó mediante inmunodetección.

22. Ensayo de rescate de la expresión de los genes *angpt1* y *tgfbr2*

Con el objetivo de clonar y sobre-expresar tanto a ANGPT1 como al receptor TGFBR2 se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos, el primer par de oligonucleótidos específico para amplificar el marco de lectura abierto (ORF) de ANGPT1 (NM_001146.4) los cuales fueron 5'-CCCAAGCTT ATGACAGTTTTCTTTCCTTTGCT-3' (Forward) y 5'-CCGCTCGAG TGTGAACTCAAACGGCTCCA-3' (Reverse) el segundo par de oligonucleótidos específico para amplificar el marco de lectura abierto (ORF) de TGFBR2 (NM_001024847.2) 5'-CCC AAGCTT ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGG-3' (Forward) and 5'-CCG CTCGA GTTTGGTAGTGTTTAGGGAGCCGTCT-3' (Reverse). Las secuencias correspondientes a los ORFs tanto de ANGPT1 como de TGFBR2 fueron amplificadas a partir de cDNA obtenido mediante retrotranscripción de 1 µg de RNA total extraído de la línea celular MDA-MB-231, se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% que no hubiera amplificación de fragmentos inespecíficos, posteriormente se realizó restricción enzimática a los amplificados empleando las enzimas, *HindIII* y *XhoI*, los fragmentos restringidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron a partir de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

y se diluyeron a una concentración de 10ng/μl así mismo restringió el vector de expresión en mamíferos pCDNA3 (Thermo Scientific) el cual después de la purificación se diluyó a una concentración de 100ng/μl. Las reacciones de ligación se prepararon utilizando 100 ng de plásmido restringido y purificado, se montaron 4 reacciones de ligación para cada inserto (relación molar vector: inserto) 1:1, 1:3, 1:6 1:0 a un volumen final de 10 μl (x μl del inserto diluido, agua libre de nucleasas cbp 10 μl, 1 μl de buffer de ligasa T4 10x, 1 μl (100 ng) del vector pmiR-repor-Luc (Applied Biosystems) y 1 μl de T4 DNA ligasa (5 U/μl). Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1 μl de solución de hibridación de DNA 1x) y se incubaron durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación son empleados para transformar células *E. coli* DH5α competentes como se describió anteriormente obteniendo así las construcciones pCDNA3-ANGPT1 y pCDNA3-TGFBR2. Todas las construcciones fueron expandidas y purificadas por lisis alcalina, posteriormente mediante secuenciaron se comprobó la fidelidad e identidad de las secuencias clonadas.

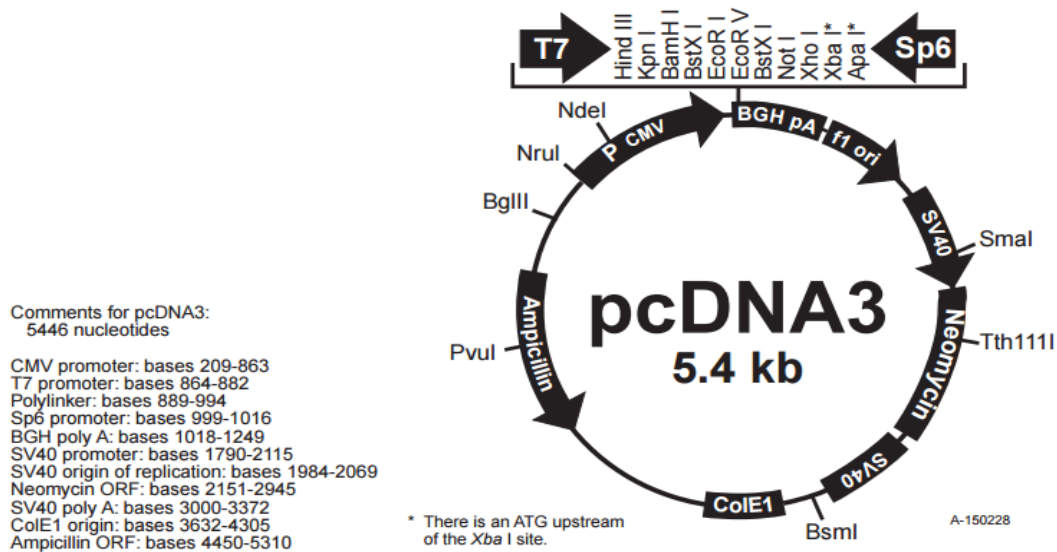


Figura 11. Mapa del vector de expresión pcDNA3. Los insertos correspondientes el ORF de *angpt1* y *tgfb2* fueron ligados en el plasmido pcDNA3 entre los sitios de restricción *HindIII*.y *XhoI*.

Una vez que se amplificaron y purificaron las construcciones pCDNA3-ANGPT1 y pCDNA3-TGFBR2 fueron, transfectadas mediante lipofección en células MDA-MB.231, para ello, se sembraron 250,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 6 pozos y se incubaron en condiciones normales, al día siguiente (Reacción de transfección para un pozo), en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 5 µg de la construcción pCDNA3-ANGPT1 o pCDNA3-TGFBR2 y se mezclaron con 150 µl de OptiMEM, por otro lado en un tubo cónico de 1.5 ml se colocaron 9 µl de lipofectamina 2000 reagent (INVITROGEN) y se mezcló con 150 µl de OptiMEM. Ambos tubos se mezclaron por pipeteo, se les dio un spin y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a TA. Pasado el tiempo de incubación se mezcló el contenido de ambos tubos en uno solo, se le dio un spin y se incubó por 10 minutos a TA. Las células se lavaron 2 veces con PBS estéril pH7.0, posteriormente se les adicionó 1.8 ml de medio DMEM sin complementar; Pasado el tiempo de incubación se les adicionaron los complejos lipofectamina-DNA (200 µl) correspondiente a cada pozo, y se mezcló lentamente con movimientos circulares durante 1 min y se incubaron las células durante 4 horas en condiciones normales. Pasado el tiempo de incubación se les retiró el medio a las células y se les adicionó 2000 µl de DMEM debidamente complementado, las células se incubaron en condiciones normales durante 48h. Como control se utilizaron células tratadas únicamente con el agente transfectante. Se analizó la expresión de las proteínas ANGPT1 y TGFBR2 mediante inmunodetección

Para la realización de los ensayos de angiogénesis *in vitro* se sembraron 250,000 células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 6 pozos y fueron transfectadas con el premiR-204 o Scramble como se describió anteriormente, 24 horas después se co-transfectaron las construcciones pCDNA3-ANGPT1 o pCDNA3-TGFBR2 como se describió anteriormente, 48 horas posterior a la transfección de las construcciones, 10,000 células transfectadas con el premiR-204, premiR-scramble, premiR-204/ pCDNA3-ANGPT1, premiR-204/ pCDNA3-TGFBR2 premiR-Scramble/ pCDNA3-ANGPT1 y premiR-Scramble/ pCDNA3-TGFBR2 fueron sembradas por triplicado sobre BME o MATRIGEL por pozo en una placa de 96 pozos en medio DMEM sin complementar, 24 horas después se sembraron 10,000 células HUVEC en cada pozo (co-cultivo), 24 h después de la realización de los co-cultivos se analizó la formación de túbulos como se describió anteriormente. Cada experimento fue realizado por triplicado y expresado como el promedio $\pm$ S.D. $p < 0.05$ fue considerado para determinar que los resultados son estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

1.0 Evaluación de la expresión del miR-204 en biopsias de tejido mamario tumoral y tejido mamario normal.

Para cumplir con este objetivo se analizaron biopsias que fueron obtenidas del FUCAM, del hospital Juárez de México y el INCAN, de cada muestra analizada se obtuvieron: datos histopatológicos del tumor, expresión de receptores a estrógenos (ER), receptores a progesterona, (PR) así como del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu), clasificación tumoral, estadio clínico y grado tumoral. Así mismo se analizaron biopsias de tejido mamario adyacente sano. En total se analizaron 84 biopsias de tejido mamario, 26 de las cuales eran tejido sano y 58 de tejido tumoral. En la tabla 9 se muestran las características de las biopsias que fueron analizadas mediante qRT-PCR con sondas TaqMan, donde se puede observar que de las 58 biopsias de tejido tumoral analizadas 5 biosias corresponden al subtipo HER2+, 25 al subtipo luminal A, 7 al luminal B, 17 eran triple negativo y 4 biopsias no contaban con clasificación la mayoría de las biopsias correspondían a estadio clínico II y III (27 y 19 muestras respectivamente) siendo loas estadios clínicos I y IV los más escasos (8 y 4 muestras respectivamente). Los resultados indican que la expresión del miR-204 se encuentra significativamente disminuida ($p < 0.05$) en las biopsias de tejido mamario tumoral esto al comparar con las biopsias de tejido normal, como se puede observar en la figura 12 así mismo para validar estos resultados en una cohorte más grande se analizó la expresión del miR-204 en un total de 776 biopsias de tejido mamario tumoral contra la expresión del tejido mamario

adyacente sano (muestras pareadas) utilizando los datos publicados por The Cáncer Genome Atlas (TCGA) donde pudimos comprobar que en promedio la mayoría de las biopsias tumorales analizadas presentan una expresión significativamente menor ($p=0.001$) del miR-204 esto al comparar con el tejido normal figura 13.

Así mismo agrupamos las biopsias tumorales con base en su grado tumoral en bajo y alto grado tumoral (Según la Organización mundial de la Salud se considera cáncer de bajo grado a aquellos tumores que se encuentran en estadio clínico I y II mientras que estadio clínico III y IV son considerados de alto grado) con el objetivo de analizar si la expresión del miR-204 Correlaciona con el estadio clínico, previamente Ying y cols observaron que en cáncer cerebral existe una menor expresión del miR-204 conforme el estadio tumoral aumenta. Nosotros pudimos observar que en la expresión del miR-204 se encuentra disminuida significativamente ($p< 0.05$) en aquellas biopsias con consideradas de alto grado (estadio III y IV) esto al comparar con la expresión promedio de las biopsias de bajo grado tumoral (estadio I y II) como se puede observar en la figura 14

Tabla 9. Características clínicas de las biopsias de tejido mamario tumoral analizadas para determina la expresión del miR-204 mediante qRT-PCR

Características	No. de pacientes (n=58)
Clasificación	
HER2 positivo	5
Luminal A	25
Luminal B	7
Triple negativo	17
Desconocido	4
Histopatología	
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	17
Carcinoma ductal Infiltrante	20
Carcinoma lobular infiltrante	8
Carcinoma invasivo musinoso	3
Carcinoma mezclado (Ductal y Lobular)	6
Otros	4
Estadio Clínico	
I	8
II	27
III	19
IV	4
Biopsias normales	26

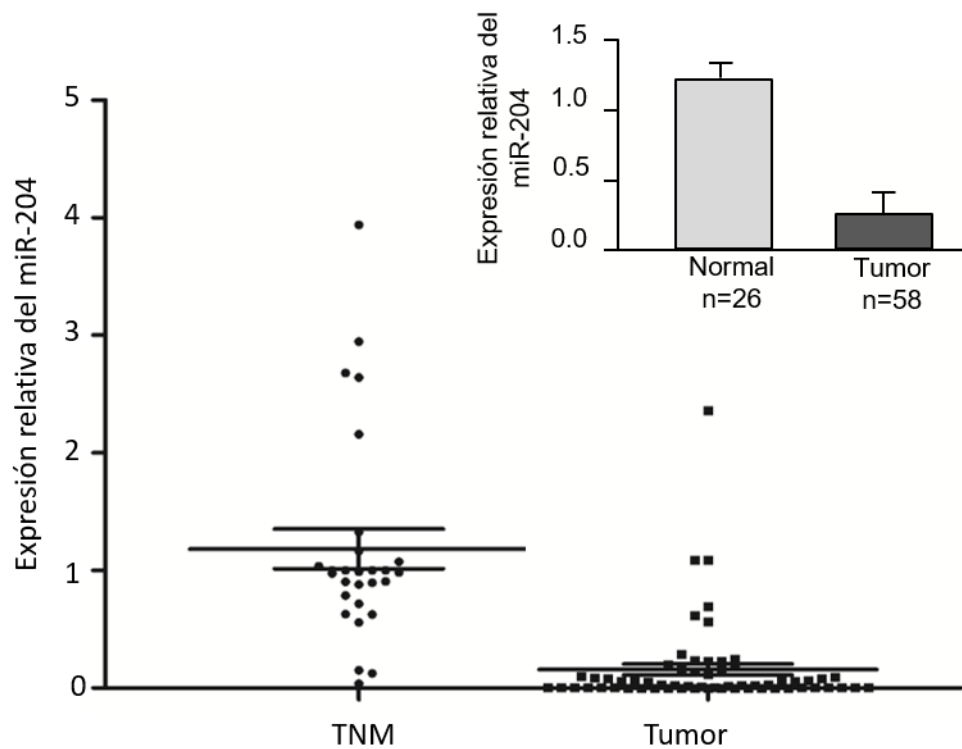


Figura 12. Expresión del miR-204 en biopsias de tejido mamario normal y tejido mamario tumoral. En el grafico de puede observar que el miR-204 se encuentra reprimido en la mayoría de las biopsias de tejido mamario tumorales, no así en las biopsias de tejido normal. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados para determinar que los resultados son estadísticamente significativos.

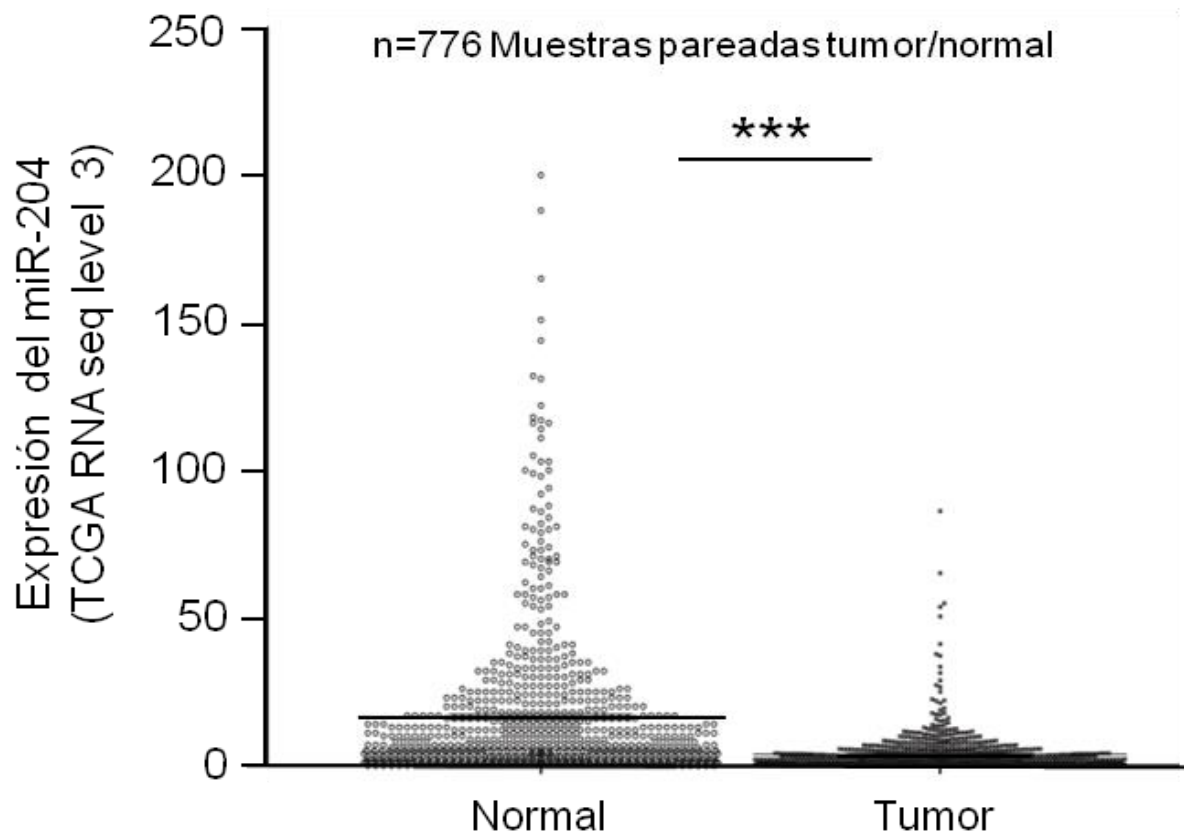


Figura 13. El mi 204 se encuentra reprimido en cáncer de mama. En el grafico se muestran los resultados del análisis de la expresión del miR-204 en 776 biopsias de tejido mamario tumoral contra la expresión del tejido mamario adyacente sano (muestras pareadas) utilizando los datos publicados por The Cáncer Genome Atlas (TCGA) *** p-value >0.0001.

De igual manera con el objetivo de determinar existe una correlación entre la expresión del miR-204 y características clínicas como expresión de los receptores ER, PR y HER 2 y subtipo clínico se analizó la expresión del miR-204 en biopsias agrupadas con base en estos datos clínicos. Los resultados obtenidos mostraron que aunque las biopsias correspondientes al subtipo triple negativo presentaron en promedio una expresión menor que los otros subtipos, esta diferencia en la expresión del miR-204 no es significativa ($p>0.05$) (Figura 15). Así mismo al analizar si había correlación entre la baja expresión del miR-204 con la expresión de los receptores ER, PR, HER2 o la ausencia de los tres, no se lograron observar diferencias significativas (Figura 16).

Estos resultados indican que la baja expresión del miR-204 es un evento que está presente desde etapa muy tempranas en el desarrollo del cáncer de mama así mismo que existe una asociación entre la baja expresión del miR-204 y el estadio clínico habiendo una menor expresión en aquellos tumores que se encuentran en estadio clínico III y IV esto al comparar con la expresión de tumores en estadio I y II. Por otro lado pudimos observar que no existen hasta este punto evidencias de que haya una correlación entre la expresión del miR-204 y la expresión de receptores (ER, PR y HER2) así como de su subtipo clínico.

Figura 14. Expresión del miR-204 en biopsias tumorales con base en estadio clínico. En la figura se muestra la expresión del miR-204 en cáncer de mama con base a estadio clínico estadio I, II, III y IV. $p < 0.05$ como normalizador se utilizó la expresión de RNU44

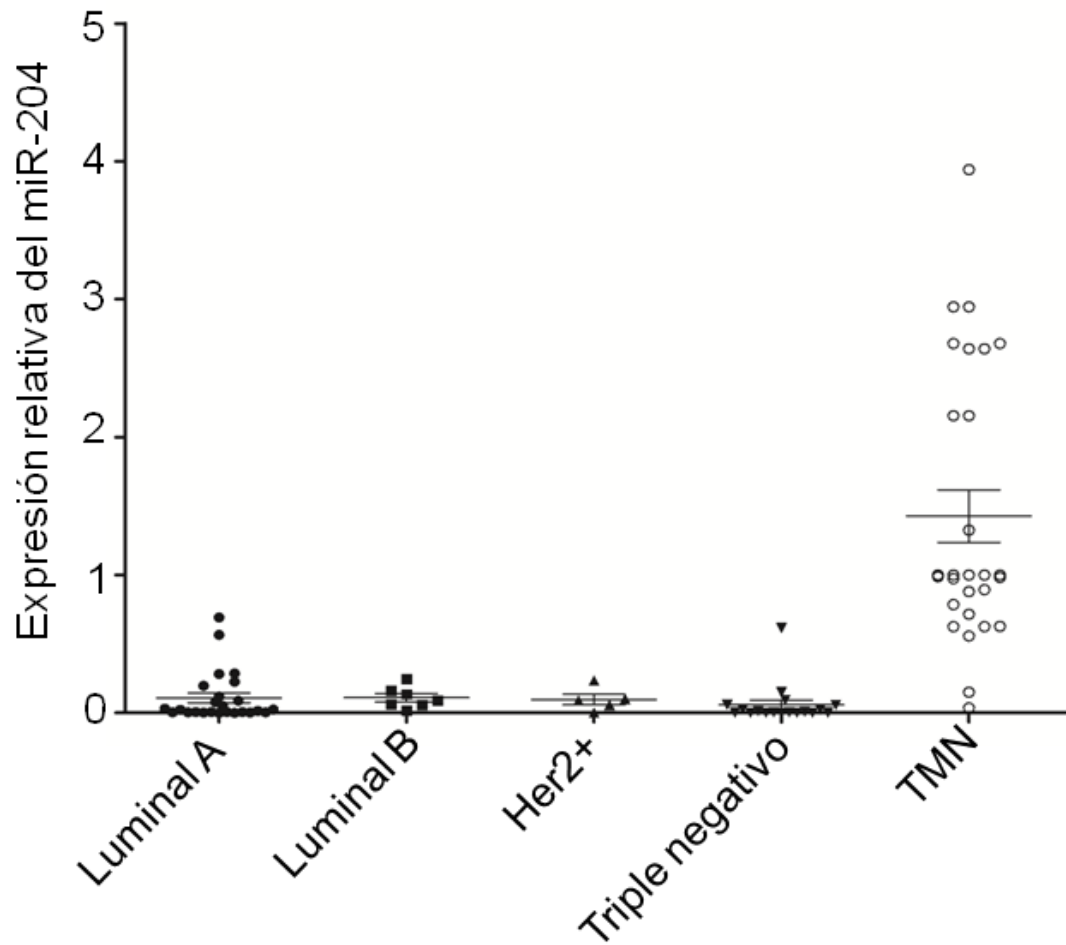


Figura 15. Análisis de la expresión del miR-204 en biopsias de tejido mamario tumoral con base en el subtipo tumoral. $p < 0.05$ como normalizador se utilizó la expresión de RNU44

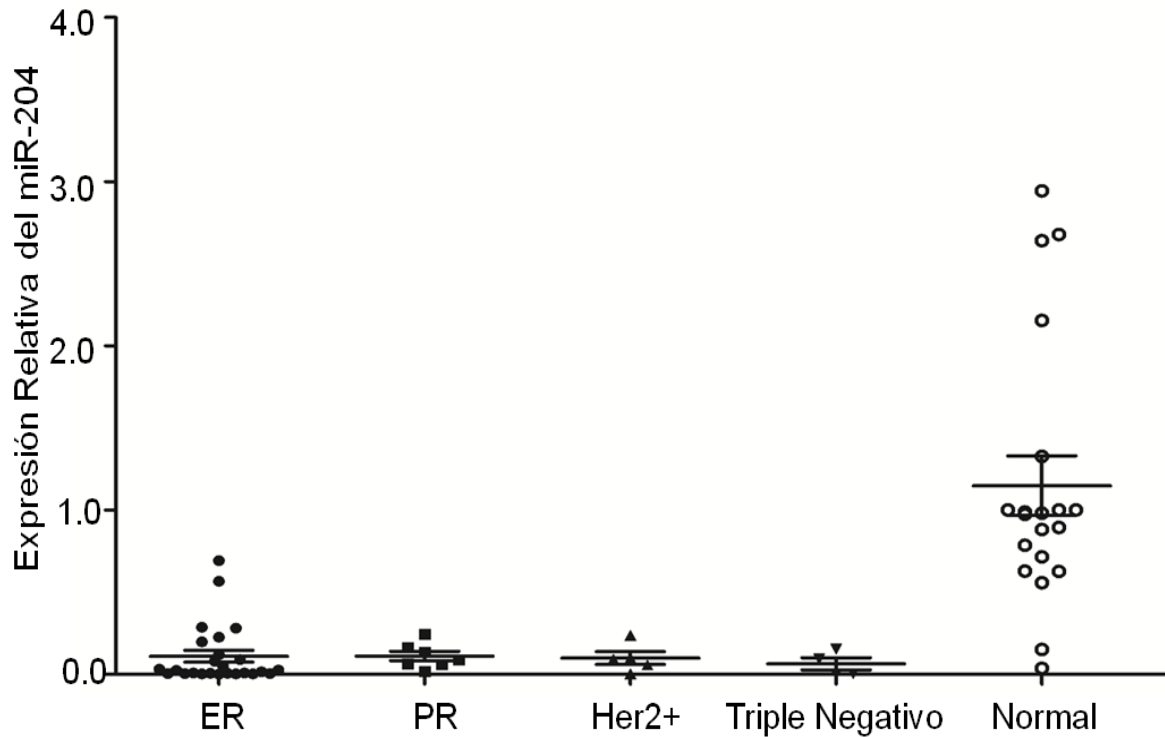


Figura 16. Análisis de la expresión del miR-204 en biopsias de tejido mamario tumoral con base en la expresión de los receptores a estrógeno (ER) receptores a progesterona (PR) receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER) o la ausencia de dichos receptores (triple negativo). $p < 0.05$ como normalizador se utilizó la expresión de RNU44.

2.0 Análisis de la expresión del miR-204 en líneas celulares de cáncer de mama.

Para correlacionar la disminución en la expresión del miR-204 observada en las biopsias tumorales, se analizó la expresión del miR-204 en 6 diferentes líneas celulares de cáncer de mama las cuales fueron: MDA-MB-231, MCF-7, ZR-75-1, T47D, MDA-MB-453 y SKBR-33, como control se analizaron 10 biopsias de tejido mamario normal (TMN) así mismo se analizó la expresión del miR-204 en la línea celular de fibrosis quística mamaria (no tumoral) MCF-10A. En figura 17 se puede observar que al analizar la expresión del miR-204 mediante qRT-PCR empleando sondas TaqMan en las distintas líneas celulares derivadas de cáncer de mama todas presentan disminución en la expresión del miRNA-204 al comparar con el TMN y la línea celular MCF-10A. De manera interesante observamos que una hay una menor expresión de este miRNA en la línea celular MDA-MB-231 la cual es una línea celular altamente invasiva y que además corresponde al subtipo tumoral triple negativo. Así mismo la línea celular de CM fue la que mostro una mayor expresión del miR-204, lo cual resulta interesante dado que si bien es tumurogenica y tiene la capacidad de migrar, esta línea celular no es invasiva, así mimo pertenece al subtipo tumoral más común entre los entre los tumores mamarios, el Luminal A, (expresa los receptores ER y PR pero no sobre-expresa al receptor HER2.) Con base en los resultados obtenidos las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 fueron elegidas para realizar posteriores ensayos.

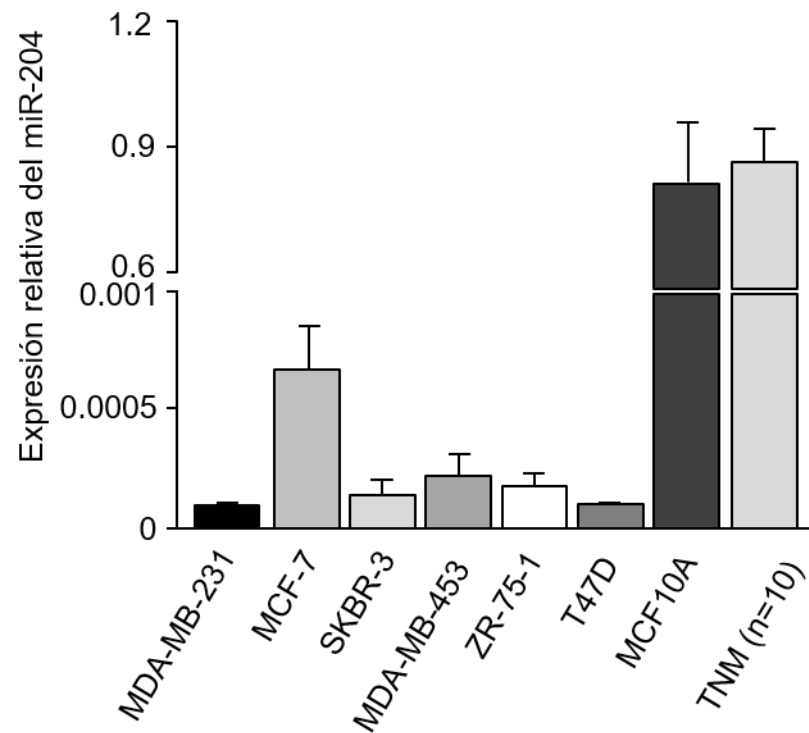


Figura 17. Expresión del miR-204 en líneas celulares de cáncer de mama. Análisis de expresión del miR-204 en 6 líneas celulares de cáncer de mama, se utilizaron como control a la línea celular no tumorigénica MCF-10 A, tejido mamario normal (10 biopsias). Se utilizó como normalizador la expresión del pequeño nucleolar RNU-44. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S.

3.0 Identificación de los mRNAs blanco del miR-204.

3.1 Sobreexpresión del miR-204 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Para llevar a cabo este objetivo se transfectó el precursor del miR-204 en una línea celular de cáncer de mama con el objetivo de restablecer o sobreexpresar al miR-204 y determinar cuáles con los genes modulados por este miRNA, Previamente se ha reportado que el miR-204 se encuentra involucrado en migración, invasión celular, metástasis y apoptosis por lo que elegimos trabajar con la línea celular MDA-MB 231, puesto que esta es una línea altamente metastásica, tumorigenica, tiene una tasa de replicación entre 24 y 36 hrs y representa al grupo de los tumores triple negativos los cuales son el tipo de tumoral con peor pronóstico y más difícil tratamiento, por lo cual resulta interesante trabajar con esta línea celular además de que al analizar la expresión del miR-204 en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, la línea celular MDA-MB-231 fue la que mostro la menor expresión relativa del miR-204 comparado con las demás líneas celulares analizadas. Posteriormente se decidió trabajar con dos concentraciones distintas del precursor 30 nm y 50 nm esto con base a lo reportado previamente en otros trabajos, como control de la reacción de PCR se analizó la expresión del miR-21 el cual se encuentra ampliamente reportado como sobreexpresado en distintos tipos de cáncer incluyendo mama, como normalizador se analizó la expresión de RNU44 y finalmente como control de expresión se analizó el promedio de 10 tejidos mamarios normales (Figura 18).

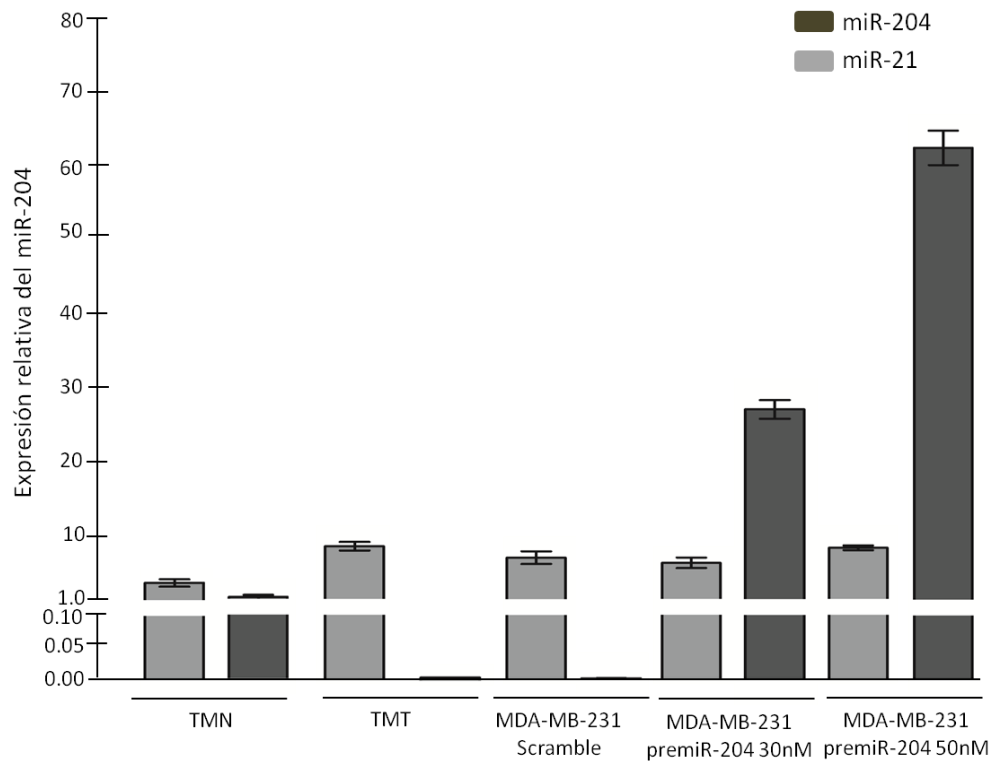


Figura 18. Sobreexpresión del miR-204 en la línea células MDA-MB-231. se transfectó la línea celular MDA-MB-231 con el premiR-204 a dos concentraciones diferentes, 30 nM y 50 nM. Como control de transfección se analizó la expresión del miR-21 así mismo se analizó la expresión del miR-204 en un pool de 10 biopsias de TMN y TMT. Se utilizó como normalizador la expresión del pequeño nucleolar RNU-44. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos muestran que al transfectar a las células con el pre-miR-204 a una concentración de 30 nM se obtiene un aumento en la expresión de aproximadamente 30 veces más que en las biopsias de tejido mamario normal así mismo al transfectar las células con una concentración de precursor de 50 nM podemos observar que hay un incremento de alrededor de 60 veces más con respecto al tejido normal por otro lado la expresión del miR-21 no presenta diferencias significativas al comparar su expresión en biopsias de tejido tumoral con respecto a la línea celular MDA-MB-231 transfectada a ambas concentraciones de premiR-204. Como control de transfección se utilizó el Scramble a una concentración de 30 nM como podemos ver en la figura 18 no hay incremento en la expresión del miR-204 ni variación en la expresión del miR-21 en los controles.

3.2 Análisis del efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la viabilidad celular.

Con el objetivo de analizar si el miR-204 es capaz de tener un efecto sobre la viabilidad celular, se transfectaron 250,000 células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de pre-miR-204, 30 nM, 50 nM y 100 nM, 48 horas después de la transfección se analizó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Nuestros resultados indicaron que la transfección con el pre-miR-204 en empleando diferentes concentraciones, no generó cambios morfológicos visibles en las células figura 19A, así mismo al comparar la viabilidad de las células transfectadas contra el control sin transfectar no se observaron diferencias significativas en la

viabilidad celular en las diferentes condiciones analizadas figura 19B. Finalmente y una vez que se estandarizo la transfección y se determinó que la sobre-expresión del miR-204 no afecta la viabilidad celular por sí mismo, decidimos trabajar con la concentración de 30 nm para subsiguientes ensayos.

3.3 Análisis de la expresión de mRNAs modulados por el miR-204 en células MDA-MB-231 mediante microarreglos.

Como ya se describió anteriormente, los microRNAs regulan de manera negativa la expresión génica a nivel post-transcripcional (principalmente), esto a través de la degradación o inhibición de la traducción de sus mRNAs blanco lo cual tiene un efecto directamente en la regulación de los procesos y rutas celulares en los cuales se encuentran involucrados dichos mRNAs. Por lo que resulta importante determinar cuáles son los mRNAs blanco que regula el miR-204 en las células tumorales, por lo que para determinar cuáles son los blancos directos así como los blancos indirectos del miR-204, se realizó el análisis de perfiles de expresión génica de células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-204 (30 nM) o con el pre-miR-Neg-ctrl (30 nM) esto mediante la hibridación de microarreglos de expresión los cuales son herramientas poderosas que nos sirven para determinar cambios en la expresión de genes en determinada condición, como por ejemplo 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 ser regulados de manera indirecta por los mecanismos celulares encendidos o apagados por los miRNAs.

Para ello se procedió a la hibridación y análisis de un micro arreglo de expresión Nimble Gene Expresión 12x135 Arrays, cada laminilla contiene 12 micro arreglos, con 13,5000 sondas cada uno correspondientes a 45,032 genes.

Una vez que se escaneo el micro arreglo y se obtuvieron los datos crudos estos fueron normalizados y analizados utilizando los softwares ANAIS Versailles y Nimble Scan respectivamente, se seleccionaron solo aquellos genes que poseían un valor de $p < 0.05$ por lo que de los 45,032 genes analizados solo nos quedamos con 2,503 genes, así mismo solo seleccionamos aquellos genes que tuvieran un tasa de cambio (FC) mayor o menor a 1.5 veces, seleccionando para su posterior análisis solo 216 genes reprimidos ($p < 0.05$, $FC < -1.5$) y 311 genes sobre-expresados ($p < 0.05$, $FC > 1.5$). En la tabla 10 se muestran todos los genes modulados por el miR-204 en células MDA-MB-231 con una tasa de cambio < -1.5 de igual manera en apéndice 1 se muestran aquellos genes modulados una tasa de cambio $> +1.5$.

Con el fin validar los resultados obtenidos del microarreglo de expresión génica de células MDA-MB-231 transfectadas con el miR-204 se analizó la expresión de 10 genes (6 genes reprimidos y 4 sobre-expresados) mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR), para ello se seleccionaron los genes IPO5, RPS6, TIMP2, EGFR2, ESR1, CCND1, PRKAA1, EGR3, ESR1, TCERG1L, CHRNA4 como normalizador se utilizo el gen GAPDH el cual no cambia su expresión en las condiciones analizadas, los resultados obtenidos indican que hay concordancia entre los resultados obtenidos en el microarreglo y los que se obtuvieron del análisis mediante qRT-PCR lo cual nos da la certeza de que los datos obtenidos en el microarreglo son confiables como se puede observar en la figura 20.

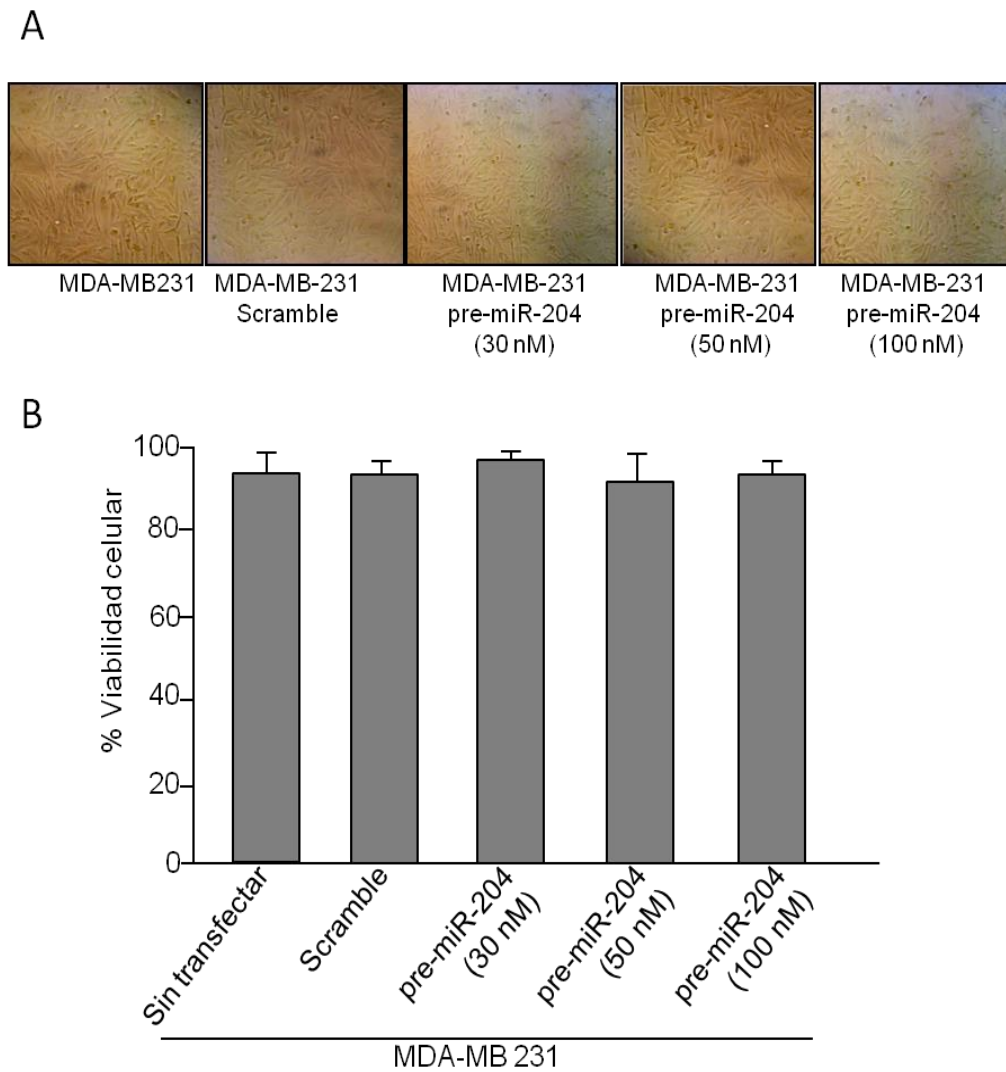


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la viabilidad celular A) análisis morfológico de la línea celular MDA-MB-231 tranfectada con el pre-miR-204 B) análisis de viabilidad celular de células MDA-MB-231 tranfectadas a diferentes concentraciones del pre-miR-204 mediante ensayo de MTT. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S $p < 0.05$.

Tabla 10. Genes modulados por el miR-204 en células MDA-MB-231 con una tasa de cambio <-1.5 y valor de $P < 0.05$

Símbolo	Nombre del gen	Tasa de cambio	Valor de <i>p</i>
DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	-7.600120279	0.033076976
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	-7.505235256	1.14488E-05
COPS8	COP9 signalosome subunit 8	-7.498223133	0.000193183
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	-7.259024993	0.002291964
CIR1	Corepressor interacting with RBPJ, 1	-7.131696896	0.004055623
IPO5	Importin 5	-6.875238283	0.002765531
DBT	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	-6.775597924	0.000784565
TACC2	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	-6.535947139	0.006274121
SFXN3	Sideroflexin 3	-6.365643504	0.001713546
HIST1H2AI	Histone cluster 1, H2ai	-6.203070336	0.034329018
UBE2V1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	-6.048074265	0.00259796
ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	-5.835032518	0.014474643
ZRANB1	Zinc finger, RAN-binding domain containing 1	-5.815258919	0.037498683
ASB3	Ankyrin repeat and SOCS box containing 3	-5.59751899	0.01696645
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	-5.577433558	0.045588291
PHLPP2	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2	-5.544773654	0.000322173
TRIM14	Tripartite motif containing 14	-5.370170508	0.003067532
TPI1P2	Triosephosphate isomerase 1 pseudogene 2	-5.367397372	0.000588935
FAM173B	Family with sequence similarity 173, member B	-5.223220937	0.024012677
SEPN1	Selenoprotein N, 1	-4.884229553	0.009319759
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	-4.727766112	0.02631475
C20orf177	Family with sequence similarity 217, member B	-4.633326144	0.042506462

Resultados

PELP1	Proline, glutamate and leucine rich protein 1	-4.544808792	0.007852784
CDCA7	Cell division cycle associated 7	-4.51054089	0.045823502
UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)	-4.479235498	0.000871919
FBXW4	F-box and WD repeat domain containing 4	-4.469762762	0.001094859
POLQ	Polymerase (DNA directed), theta	-4.325214706	0.044281234
LRRK1	Leucine-rich repeat kinase 1	-4.320783728	0.004295812
ATP1A3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	-4.148155729	0.031929814
LLGL1	Lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila)	-4.096251371	0.020365566
AP1S3	Adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit	-4.07672092	0.040061341
TMEM110	Transmembrane protein 110	-4.062653522	0.001074031
GPR21	G protein-coupled receptor 21	-4.019994748	0.019583731
TTC31	Tetratricopeptide repeat domain 31	-4.019325732	0.044972728
C15orf29	Katanin p80 subunit B-like 1	-3.970558267	0.012637748
C1QTNF9	C1q and tumor necrosis factor related protein 9	-3.968544805	0.001733392
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha	-3.912157998	0.017186824
CCDC46	Centrosomal protein 112kDa	-3.905243791	0.012967531
PELI3	Pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 3	-3.83143874	0.001760835
ARHGEF26	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 26	-3.775767554	0.015926424
KIF21A	Kinesin family member 21A	-3.736064243	0.049833355
TTC23	Tetratricopeptide repeat domain 23	-3.639278864	0.022184442
LPA	Lipoprotein, Lp(a)	-3.61312927	0.042991833
PIN4	Protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	-3.515486216	0.007553857
ALPK1	Alpha-kinase 1	-3.506793432	0.007860516
HIST1H3A	Histone cluster 1, H3a	-3.455304131	0.017346581
TMEM20	Solute carrier family 35, member G1	-3.366852492	0.018540267
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1	-3.346031466	0.029524652
NMNAT2	Nicotinamide nucleotide	-3.317019892	0.006345555

Resultados

adenylyltransferase 2			
TMEM87A	Transmembrane protein 87A	-3.31384532	0.043311109
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	-3.187055487	0.019236431
ANK3	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	-3.185978895	0.049406163
MPZL2	Myelin protein zero-like 2	-3.131002279	0.037296383
GMCL1	Germ cell-less, spermatogenesis associated 1	-3.11733432	0.046592404
LRRC37A4	Leucine rich repeat containing 37, member A4, pseudogene	-3.083692269	0.000584618
CEP57L1	Centrosomal protein 57kDa-like 1	-3.066386858	0.001459104
LPL	Lipoprotein lipase	-3.047478667	0.002491797
SLC19A3	Solute carrier family 19, member 3	-3.011121412	0.012013619
ZNF768	Zinc finger protein 768	-2.958014248	0.043399883
ATP10D	ATPase, class V, type 10D	-2.911568564	0.005951964
PSMA2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	-2.884504615	0.01841344
GFRA1	GNF family receptor alpha 1	-2.809792319	0.046141078
SPTBN1	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1	-2.784634846	0.009588059
TSPAN12	Tetraspanin 12	-2.784235776	0.027239815
CHAC2	ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)	-2.776076981	0.049916404
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	-2.774953233	0.000949333
PLCG1	Phospholipase C, gamma 1	-2.758284594	0.022071817
LRP8	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	-2.745884288	0.022326386
HOOK3	Hook homolog 3 (Drosophila)	-2.706004983	0.017192604
FAM189B	Family with sequence similarity 189, member B	-2.688957145	0.035374184
TUBA8	Tubulin, alpha 8	-2.674153192	0.034582759
ASB3	Ankyrin repeat and SOCS box containing 3	-2.638287191	0.029979492
TMEM106B	Transmembrane protein 106B	-2.627319035	0.021105531
CTGF	Connective tissue growth factor	-2.617207212	0.031884248
CREB5	CAMP responsive element binding protein 5	-2.595131574	0.018394616
CHPF2	Chondroitin polymerizing factor 2	-2.537555174	0.006487515

Resultados

MARK1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	-2.508029939	0.00632717
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	-2.50146967	0.042069989
LRRC43	Leucine rich repeat containing 43	-2.478191312	0.036235137
KRTAP17-1	Keratin associated protein 17-1	-2.456339488	0.04478117
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	-2.428944471	0.01316972
GK2	Glycerol kinase 2	-2.423771127	0.020719772
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-2.419605397	0.036140805
LGALS9	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9	-2.41016575	0.019656053
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-2.384116613	0.010809556
MEF2C	Myocyte enhancer factor 2C	-2.377740237	0.041814338
ZNF24	Zinc finger protein 24	-2.370867092	0.013792352
SPIRE2	Spire homolog 2 (Drosophila)	-2.340991974	0.000314232
DBF4B	DBF4 homolog B (S. cerevisiae)	-2.325693137	0.017517837
ZNF587	Zinc finger protein 587	-2.309070318	0.049417799
IQCG	IQ motif containing G	-2.306199778	0.034080971
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4	-2.284895346	0.046827631
HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3	-2.284739132	0.009030671
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	-2.274307026	0.005093853
C1orf35	Chromosome 1 open reading frame 35	-2.271703298	0.043826341
OTX1	Orthodenticle homeobox 1	-2.265331678	0.033481502
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1	-2.25621444	0.048453336
VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	-2.249392235	0.02831524
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	-2.246356332	0.049901407
GAR1	GAR1 ribonucleoprotein homolog (yeast)	-2.227559272	0.013226163
SLC7A2	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-2.223488874	0.026029559
BET1L	Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein-like	-2.222693133	0.008218634
CRTC1	CREB regulated transcription	-2.221704572	0.011968715

Resultados

	coactivator 1		
MPZL2	Myelin protein zero-like 2	-2.213121336	0.002053079
LOC100131530	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	-2.211623615	0.029544371
KIAA1217	KIAA1217	-2.203987553	0.006355063
NEFL	Neurofilament, light polypeptide	-2.172870948	0.043479356
ZNF17	Zinc finger protein 17	-2.167836901	0.043799268
ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	-2.131455195	0.016002495
SETD7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	-2.129003319	0.043397318
ASNS	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	-2.127579246	0.019857536
TSPAN33	Tetraspanin 33	-2.126568165	0.029212537
MRPS25	Mitochondrial ribosomal protein S25	-2.109816817	0.007969962
ZFYVE28	Zinc finger, FYVE domain containing 28	-2.075331321	0.033931317
ZNF626	Zinc finger protein 626	-2.063002181	0.011050991
SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11	-2.028449646	0.010895709
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II	-2.005131201	0.020449981
HIST1H2AM	Histone cluster 1, H2am	-1.984309932	0.023813293
PGM2	Phosphoglucomutase 2	-1.967456546	0.045837246
TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	-1.966962139	0.021527677
NLRP14	NLR family, pyrin domain containing 14	-1.966391607	0.045069829
FTSJ2	FtsJ RNA methyltransferase homolog 2 (E. coli)	-1.947398173	0.014988519
LOXHD1	Lipoxygenase homology domains 1	-1.944071769	0.048428342
ZNF33B	Zinc finger protein 33B	-1.941663723	0.005574923
SLFN1	Schlafen-like 1	-1.941447557	0.044216615
KCNE3	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	-1.922746069	0.049732685
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	-1.921150896	0.020849212
RIMS2	Regulating synaptic membrane exocytosis 2	-1.918999472	0.018003629
SMAD4	SMAD family member 4	-1.912345379	0.024288389

Resultados

ARHGEF26	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 26	-1.905022744	0.041913863
FOXC1	Forkhead box C1	-1.89834622	0.014989081
TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	-1.890681322	0.016173756
GPR3	G protein-coupled receptor 3	-1.889056335	0.022560881
CDT1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1	-1.888563917	0.02950462
FAM92A3	Family with sequence similarity 92, member A3	-1.887137196	0.042070168
ZDHHC5	Zinc finger, DHHC-type containing 5	-1.879914464	0.016996671
ANGPT1	Angiopoietin 1	-1.875464156	0.046834127
LUC7L2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	-1.871609959	0.031922448
ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	-1.862051955	0.029055952
TSPAN12	Tetraspanin 12	-1.85653147	0.00947632
TSPAN2	Tetraspanin 2	-1.851515076	0.002790727
SLC2A11	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11	-1.841772884	0.034996102
CLSPN	Claspin	-1.828738898	0.019708981
B4GALNT1	Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1	-1.806745454	0.036766828
CMBL	Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	-1.752815084	0.018903573
PDS5A	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog A (S. cerevisiae)	-1.74160254	0.006941958
PPIL2	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2	-1.718452636	0.040025257
KRR1	KRR1, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	-1.718293801	0.036022104
EREG	Epiregulin	-1.716714706	0.020493977
ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	-1.716479794	0.027608363
SRPRB	Signal recognition particle receptor, B subunit	-1.715808562	0.018923234
SLBP	Stem-loop binding protein	-1.712049679	0.018809464
LCP1	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	-1.707207094	0.00239168
OMD	Osteomodulin	-1.689208724	0.010732019

Resultados

DSCC1	Defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)	-1.686331916	0.005555564
MFAP3L	Microfibrillar-associated protein 3-like	-1.685802478	0.036859547
ASB12	Ankyrin repeat and SOCS box containing 12	-1.675783729	0.007825064
CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	-1.672386212	0.011178028
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	-1.666792373	0.018236119
WDR85	WD repeat domain 85	-1.666041049	0.036396458
HOMER1	Homer homolog 1 (Drosophila)	-1.659312214	0.027075653
LRRC16A	Leucine rich repeat containing 16A	-1.65573087	0.008716582
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	-1.654300663	0.030429082
CTPS	CTP synthase 1	-1.644627174	0.030572612
ASB16	Ankyrin repeat and SOCS box containing 16	-1.639238121	0.032760235
GNB5	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	-1.637428197	0.04761458
CDH4	Cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)	-1.635497404	0.009044984
GYG1	Glycogenin 1	-1.629964224	0.04866149
SLC7A2	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-1.622721436	0.002946491
LRP8	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	-1.621934989	0.025960035
NPM1	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	-1.620009552	0.017970705
CWC27	CWC27 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)	-1.611407805	0.013968173
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	-1.608950334	0.008017271
SLC1A1	Solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-1.600800262	0.012211085
ZNF644	Zinc finger protein 644	-1.598882022	0.005549457
EXPH5	Exophilin 5	-1.598034846	0.02752714
NBPF1	Neuroblastoma breakpoint family, member 1	-1.591962592	0.036460033
PAQR4	Progesterone and adipoQ receptor family member IV	-1.571978928	0.037648304

Resultados

SEPX1	Methionine sulfoxide reductase B1	-1.558700013	0.0007244
DSCC1	Defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)	-1.553531086	0.007621943
PAQR3	Progestin and adipoQ receptor family member III	-1.552204413	0.041269493
IGSF11	Immunoglobulin superfamily, member 11	-1.548742313	0.04806113
ID2	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	-1.539866318	0.042348352
CORO2B	Coronin, actin binding protein, 2B	-1.535614327	0.020545626
MAPRE2	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	-1.791639634	0.042757308
AAMP	Angio-associated, migratory cell protein	-1.589350929	0.019010184
PI3	Peptidase inhibitor 3, skin-derived	-1.585124996	0.040988381
C2orf14	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 30, pseudogene	-1.583673792	0.047000891
GYG1	Glycogenin 1	-1.582473716	0.048908835
C1orf150	Germinal center-associated, signaling and motility-like	-1.582083992	0.016101149
SRSF10	Serine/arginine-rich splicing factor 10	-1.576206462	0.033559637
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	-1.574611171	0.048713011
PNKD	Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	-1.566005939	0.033271148
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-1.56077915	0.009553132
C3orf64	EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	-1.560358666	0.04418495
TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	-1.557104823	0.011126897
ODF3	Outer dense fiber of sperm tails 3	-1.54650076	0.011924241
MRAP	Melanocortin 2 receptor accessory protein	-1.53926805	0.040110398
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-1.535223936	0.012169853
GJA3	Gap junction protein, alpha 3, 46kDa	-1.530830311	0.026051576
ICA1	Islet cell autoantigen 1, 69kDa	-1.528686682	0.0038626
BRP44L	Mitochondrial pyruvate carrier 1	-1.520592395	0.034119087
FERMT1	Fermitin family member 1	-1.517624848	0.013911718
PCSK7	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	-1.516329968	0.046651151

Resultados

PHF19	PHD finger protein 19	-1.515000516	0.034664426
THYN1	Thymocyte nuclear protein 1	-1.508073465	0.044816779
OR5K1	Olfactory receptor, family 5, subfamily K, member 1	-1.503391754	0.013413642
CNTN6	Contactin 6	-1.502777475	0.037148051
RAB22A	RAB22A, member RAS oncogene family	-1.500194119	0.00513918
KIAA0101	KIAA0101	-1.587391122	0.007884168
TIPIN	TIMELESS interacting protein	-1.587103131	0.049113872
R3HDM1	R3H domain containing 1	-1.564430461	0.047216281
EPB41L2	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	-1.554652784	0.044607199
SIRPG	Signal-regulatory protein gamma	-1.552530459	0.031437233
COG2	Component of oligomeric golgi complex 2	-1.548436389	0.017931706
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B	-1.544739853	0.00344987
ANGPTL2	Angiopoietin-like 2	-1.544582025	0.026971662

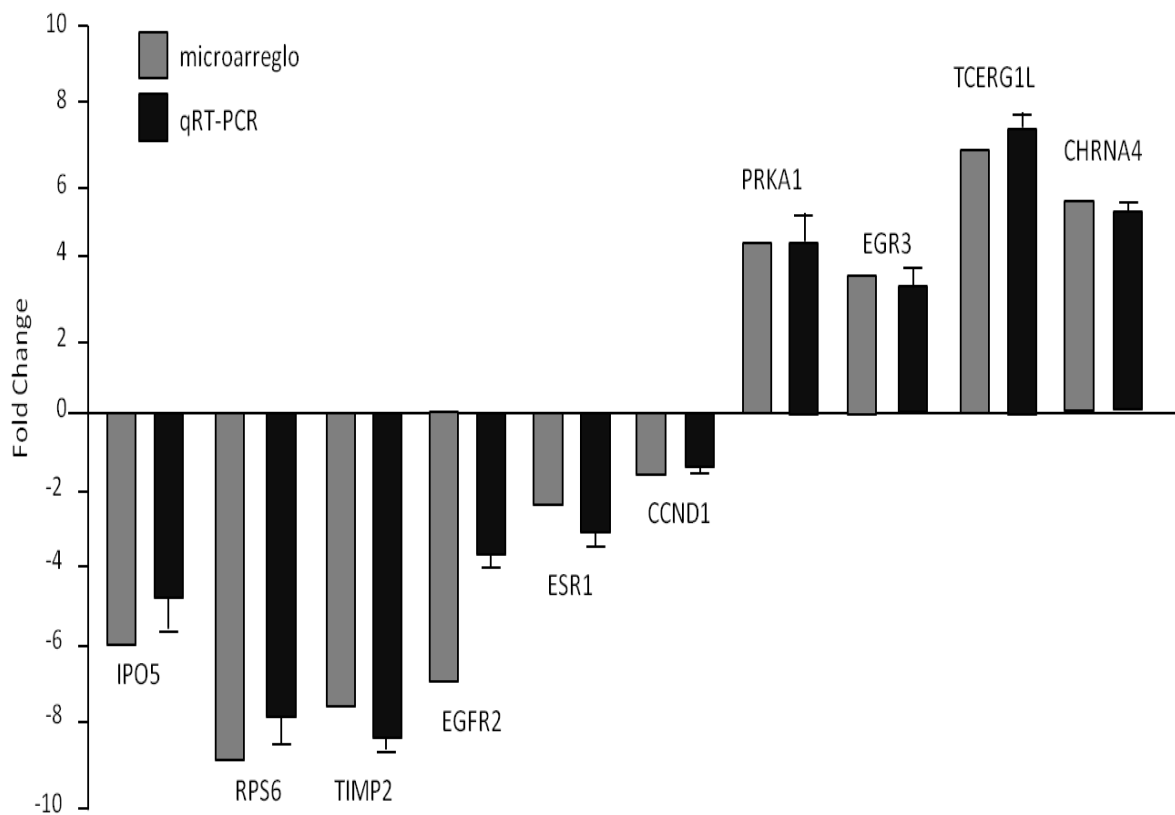


Figura 20. Validación de microarreglo de expresión mediante RT-PCR en tiempo real. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S $p < 0.05$.

3.4 Búsqueda de las posibles rutas y procesos celulares modulados los por el miR-204.

Con el objetivo de determinar cuáles son las rutas o procesos celulares regulados por el miR-204 se realizó un análisis de enriquecimiento mediante la utilización del software DAVID Bioinformatics Resources 6.7. este programa es una herramienta muy útil la cual al introducir al sistema una lista de genes los agrupa en diferentes rubros, según las categorías: proceso biológico, componente celular y función molecular, en este caso solo utilizamos los datos de procesos biológicos, Encontramos que los genes reprimidos se agrupan en procesos biológicos tales como Migración celular (47 genes), regulación de la ruta de las proteincinasas (33 genes) proliferación celular (29 genes) procesos metabólicos (26 genes), angiogénesis (19 genes), replicación (15 genes) apoptosis (14 genes), diferenciación celular (11 genes) regulación de la ruta TGF β (8 genes) señalización de la ruta BMP (6 genes) otros (8 genes) de manera interesante aquellos genes que fueron sobreexpresados por el miR-204 se agruparon en procesos celulares como: regulación del sistema inmune (41 genes), angiogénesis (40) migración celular (31 genes) proliferación celular (29), apoptosis (16) entre otros Figura 21 A y B, siendo los procesos comunes para ambos grupos de genes: proliferación, migración, angiogénesis y apoptosis por lo cual decidimos enfocarnos en esos procesos celulares.

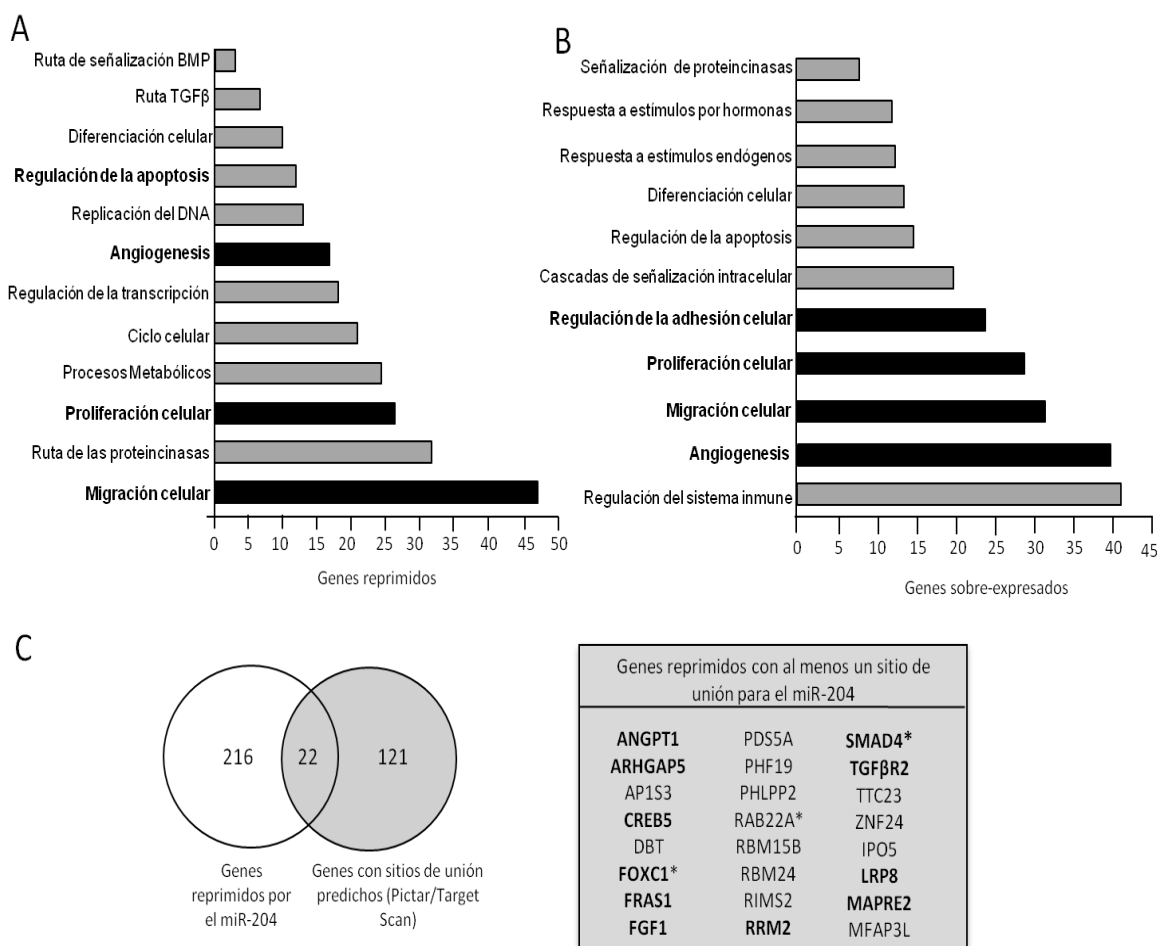


Figura 21. Análisis de enriquecimiento de los genes regulados por el miR-204 en la línea celular MDA-MB-231. Procesos celulares modulados por el miR-204 A) genes reprimidos por el miR-204 y B) genes sobreexpresados por el miR-204 C) análisis de concordancia entre los datos obtenidos del transcriptoma y las predicciones de blancos para el miR-204.

3.5. Predicción de los mRNAs blanco del miR-204.

Una vez que logramos determinar cuáles son las rutas o procesos celulares en los cuales participan los genes que fueron modulados por el miR-204 en la línea celular MDA-MB-231, nos preguntamos cuales de todos los genes que se encontraron reprimidos en el micro arreglo son blancos directos para el miR-204, para ello el primer paso fue realizar una búsqueda en el genoma de los mRNAs que poseen al menos un sitio de unión para el miR-204, esto se logró a través de predicciones *in silico*

Para la predicción *in silico* de los blancos del miR-204 se utilizaron los programas TargetScan Versión 5.2 (<http://www.targetscan.org>), PICTAR(http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertbrate.cgi), y Diana-microT versión 4.0 (<http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=microtv4/index>).

Cada programa fue utilizado con los parámetros que los programas generan por defecto. para el programa Target Scan se obtuvieron un total de 857 posibles blancos con al menos un sitio de unión conservado, para el programa PicTar se predijeron 318 posibles blancos y el programa Diana microT arrojó un total de 457 predicciones, posteriormente se realizó entrecruzamiento de datos entre las listas de blancos predichos de los tres programas, obteniendo los siguientes resultados : Target Scan/PicTar 121 coincidencias, Target/Diana microT con 63 genes en común y Diana microT/ PicTar, 21 coincidencias, por lo que se decidió trabajar con la lista de genes predichos en común por los programas Target Scan y PicTar,

finalmente se realizó entrecruzamiento entre los datos de genes reprimidos obtenidos del microarreglo de expresión (216 genes) y la predicción Target Scan/PicTar (121 genes) de este entrecruzamiento de datos resultaron 22 genes que fueron encontrados reprimidos en el microarreglo de expresión y que además poseen al menos un sitio de unión para el miR-204 por lo que estos resultados nos permiten sugerir a estos 22 genes como blancos directos del miR-204 los cuales se muestran en la figura 21, posteriormente se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar cuáles de los 22 genes se encontraban involucrados en los procesos de proliferación, migración y angiogénesis Tabla 11. De esta búsqueda pudimos encontrar que los genes : ANGPT1, CREB5, SMAD4 y TGFBR2 se encuentran asociados a la regulación de angiogénesis en distintos tipos de cáncer, así mismo, los genes CREB5, ARHGAP5, MAPRE2, RAB22A*, SMAD4 y TGFBR2 han sido reportados como asociados a proliferación celular en diferentes tipos de cáncer, de igual manera los genes CREB5 , SMAD4, TGFBR2, FOXC1*, FRAS1, LRP8, MAPRE2 se encuentran relacionados en la regulación de migración e invasión celular en distintos tipos de cáncer, finalmente se encontró que el gen RRM2 ha sido reportado con un papel importante en la quimioresistencia esto en cáncer de mama. Por otro lado encontramos que ya existen reportes que validan a los genes FOXC1 y RAB22A como blancos directos del miR-204.

De los 9 genes restantes no existe aun reportes que los asocien o validen como blancos del miR-204 por lo que decidimos trabajar con algunos de ellos para determinar su papel en los procesos biológicos con que se encuentran relacionados. Decidimos elegir a los genes ANGPT1, SMAD4, TGFBR2 y CREB5 para validarlos como blancos directos del miR-204 mediante construcciones LUC-3'UTR.

Tabla 11. Genes modulados en el microarreglo con al menos un sitio de unión para el miR204 y que participan en migración, proliferación o angiogénesis.

Símbolo	Valor de FC	Sitios de unión del miR-204	Función	Referencias
<i>angpt1</i>	-1.8754	3	Esta proteína juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis, sobrevivencia de células endoteliales, migración, adhesión, reorganización de la actina, quiescencia en células endoteliales	Moon, Park, Yu, et al. 2006. Liu XH et al. 2008. Pipsa Saharinen et al. 2011
<i>arhgap5</i>	-1.7164	2	La proteína Rho GTPase activating protein 5, regula de manera negativa a la familia de RHO GTPasas las cuales regulan cambios en el citoesqueleto, asociados a migración e invasión. Promueve proliferación celular y metástasis en cáncer de pulmón de células pequeñas.	G Fritz et al. 2002. J Wang et al. Oncogene. 2014
<i>creb5</i>	-2.5951	4	La proteína cAMP response element-binding protein 5 es un factor de transcripción que promueve tumorigenesis, juega un papel importante en proliferación, sobrevivencia celular y angiogénesis. Se encuentra sobreexpresada en distintos tipos de cáncer como cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mieloide aguda y carcinoma hepatocelular.	Tan et al. PNAS 2012 Sakamoto et al. 2010.
<i>foxc1*</i>	-1.8983	2	Esta proteína se promueve invasión en cáncer de mama, se ha observado que es capaz de inducir la degradación de la matriz extracelular a través de la inducción de la sobreexpresión de la metaloproteasa 7 (MMP7) también se ha observado que se encuentra involucrada transición epitelial-mesenquimal, contribuye en invasión microvesicular en carcinoma hepatocelular	T. Sizemore et al. J Biol Chem. 2012 Zhi-Yuan Xu et al. 2012, Xu et al. 2012
<i>fras1</i>	-1.6057	1	Este gen codifica para una proteína de matriz extracelular, la cual se ha observado que participa en la regulación de la adhesión celular. la sobreexpresión de esta proteína aumenta la migración e invasión celular en cáncer de pulmón a través de la señalización mediada por FAK	Q. Zhan et al. 2014
<i>lrp8</i>	-2.7458	1	Los receptores de lipoproteínas de baja densidad son proteínas de superficie celular que juegan un papel en la transducción de señales mediadas por endocitosis por ligandos específicos para degradación lisosomal, se ha observado que su represión en cáncer disminuye invasión y	Pencheva N. et al. 2012

metástasis.

<i>mapre2</i>	-1.5916	2	La proteína asociada a microtubulos 2 juega un papel importante en el proceso de mitosis, se ha observado que su sobreexpresión se encuentra asociada a tumorigenesis en cáncer colorectal, y juega un papel importante sobre la proliferación e invasión celular en cáncer de páncreas.	Abiatari et al. 2009
<i>rab22a*</i>	-1.5001	5	La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de pequeñas GTPasas RAB. Se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína está asociada a proliferación celular en cáncer de pulmón de células pequeñas.	Zhaoying Y. et al, 2014
<i>rrm2</i>	-1.6231	1	El aumento en la expresión de la proteína ribonucleotido reductasa subunidad M2 (RRM2) ha sido asociado con una disminución en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, así mismo se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína en pacientes luminal A está asociado con una mayor resistencia al tratamiento con tamoxifen.	Putluri N. et al, 2014
<i>smad4</i>	-1.9123	2	Esta proteína es un factor de transcripción que juega un papel importante en la ruta de TGF-beta, el silenciamiento de SMAD4 reduce significativamente la eficiencia en la formación de colonias así como la capacidad migratoria en células de cáncer hepatocelular <i>in vitro</i> .	Hernanda P. et al, 2014
<i>tgfb2</i>	-1.8906	1	Esta proteína juega un papel importante en la transducción de señales en la ruta TGF-beta, la cual en conjunto con los receptores TGFBR2 y TGFBR3 tienen la capacidad de regular un gran número de procesos celulares como ciclo celular, proliferación, transición epitelial mesenquimal, diferenciación celular, producción de la matriz extracelular, migración y angiogenesis. Se ha observado que juega un papel dual en el proceso de carcinogénesis.	Bhutia et al. 2013. Zhang et al. 2009.

4. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la regulación de la proliferación en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7

Una vez realizado el análisis del microarreglo se pudo definir que hay 3 procesos celulares los cuales podrían ser regulados por el miR-204: proliferación, migración, y angiogénesis. Con el objetivo de determinar si el miR-204 juega un papel importante en la regulación de la proliferación celular, se transfectaron células MDA-MB-231 y células MCF-7 con el premiR-204 y la secuencia Scramble a una concentración de 30 nm como control se analizaron células sin transfectar. Se realizaron ensayos para determinar proliferación celular mediante el análisis de la reducción del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en la Figura 22 A se puede observar que al sobre expresar de manera ectópica al miR-204 en la línea celular MDA-MB-231 se reduce significativamente ($p < 0.05$) su capacidad de proliferación celular esto al comparar con las células sin transfectar y células transfectadas con la secuencia Scramble. La disminución en la proliferación celular puede observarse desde las 24 horas del ensayo obteniéndose una disminución más notoria a las 48 horas de análisis.

De manera similar al medir la proliferación en la línea celular MCF-7 pudimos observar que a las 48 horas del ensayo tanto las células sin transfectar como las células transfectadas con el Scramble presentan casi el doble de proliferación celular esto al comparar con las células transfectadas con el pre-miR-204.

Así mismo para comprobar el efecto del miR-204 sobre la disminución en la proliferación celular se realizaron ensayos clonogénicos en las líneas celulares

MDA-MB-231 (C) y MCF-7 (D), en este caso se pudo observar que las células transfectadas con el pre-miR-204 generaron un menor número de colonias lo cual indica que tienen un menor potencial proliferativo esto al comparar con las células sin transfectar y transfectadas con el Scramble las cuales generaron un mayor número de colonias (aproximadamente el doble) al termino del ensayo. Lo cual nos permite inferir que el miR-204 es capaz de reprimir la proliferación en las líneas celulares de cáncer de mama.

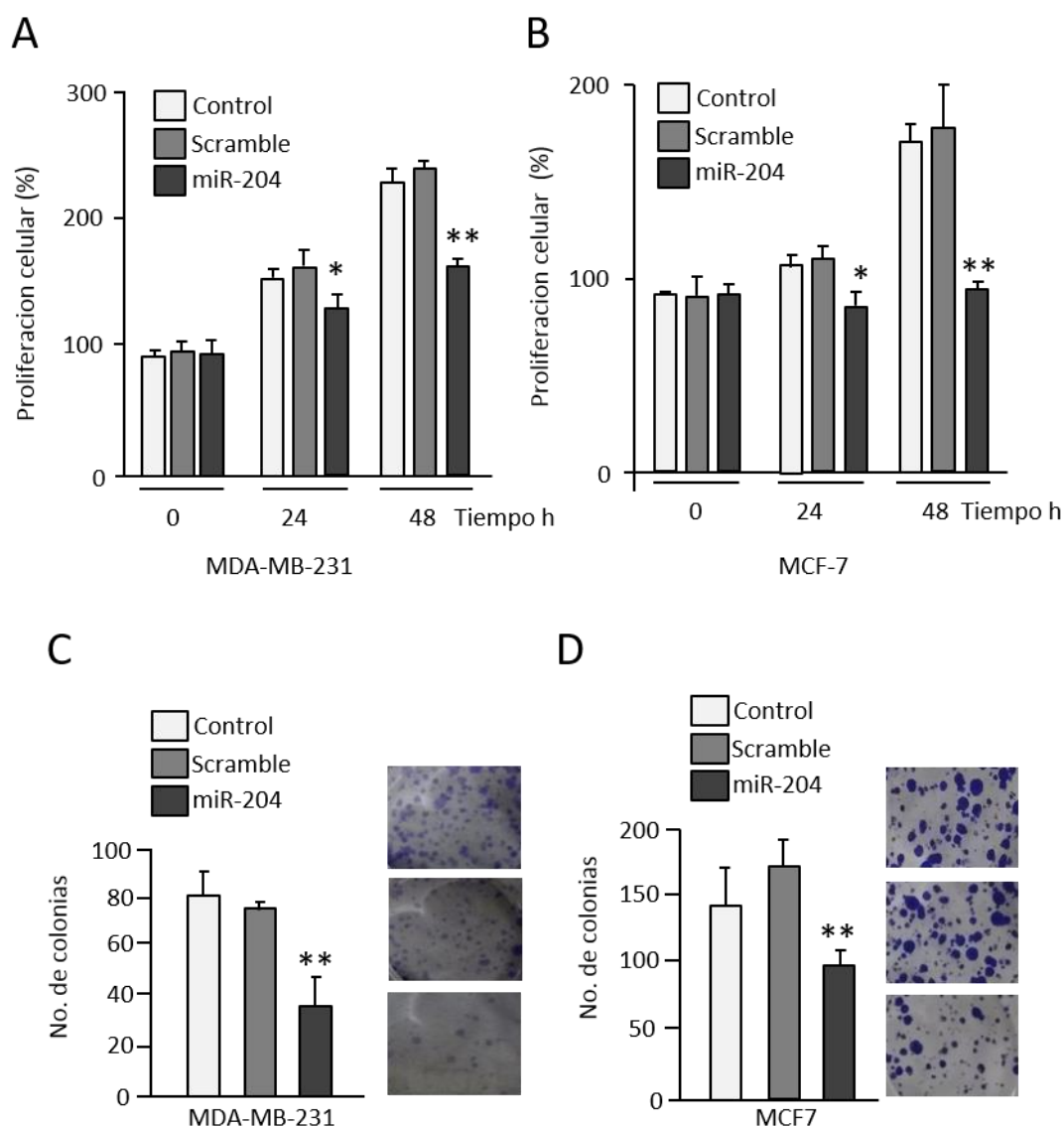


Figura 22. Efecto del miR-204 sobre la proliferación celular. A) determinación de proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7. A) Determinación de la prolidderacion celular en MDA-MB-231 mediante MTT, B) determinación de proliferación celular en MCF-7 mediante MTT, C y D determinación de proliferación celular mediante ensayo clonogénicos en células MDA-MB-231 y MCF7 transfectadas con el premiR-204 y scramble. Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * < 0.01 ** < 0.005 ***

5. Análisis del efecto del miR-204 sobre el proceso de apoptosis

Como ya se describió anteriormente, la sobreexpresión del miR-204 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 es capaz de disminuir la proliferación celular. Este resultado fue comprobado por dos metodologías distintas, sin embargo en este punto nos surgió la interrogante de saber si el efecto sobre la disminución en la reducción del MTT es debido a que las células no son capaces de incrementar su número (proliferar) igual que las células control o simplemente las células están muriendo a causa de la sobre expresión del miR-204. Para resolver esta interrogante se realizaron ensayos de apoptosis en células MDA-MB-231 transfectadas con el premiR-204 analizando el efecto la capacidad del miR-204 de promover por si solo el proceso de apoptosis a las 24 y 48 h pos –transfección (mismos tiempos en los que se midió proliferación celular). en la Figura 23 se muestra como el miR-204 no es capaz de generar apoptosis en células MDA-MB-231 transfectadas con 30nm del premiR-204 el mismo resultado se observó en el control donde se analizaron células transfectadas con el scramble, asimismo como control positivo se analizaron células tratadas con el quimioterapéutico doxorubicina .

6. Efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre los procesos celulares de migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama.

Por otra parte para determinar el efecto de la sobreexpresión del miR-204 en la migración e invasión celular se realizaron ensayos de “*wound healing*”, para lo cual se sembraron 300,000 células sobre laminillas de cristal en placas de 6

pozos, dichas células fueron transfectadas con Scramble y premiR-204 48 horas después se realiza una herida en la monocapa y se obtuvieron imágenes de la monocapa a las 12 y 24 hrs posterior a la generación de la herida, en la figura 24 se puede observar que aquellas células que fueron transfectadas con el scramble son capaces de migrar hacia donde está la herida de la monocapa y reducir el área de dicha herida hasta en un 45%, esto se puede observar desde las 12 hrs, en contraste aquellas células que fueron transfectadas con el premiR-204 no reducen el área de la herida a las 12 horas sin embargo a las 24 horas se puede observar una ligera reducción en el área de la herida además de la presencia de células que migraron hacia el centro de la herida, por otro lado las células control muestran una reducción en el área de la herida superior al 60% este resultado permite inferir que la sobreexpresión del miR-204 es capaz de inhibir la migración celular en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 de igual manera se realizó este ensayo en la línea celular MCF-7 obteniendo resultados similares. Así mismo para determinar el efecto del miR-204 en invasión celular se realizaron ensayos de invasión en cámaras transwell en las cuales se colocó una capa de matriz extracelular de ratón (matrigel) en donde se cultivaron células MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-Neg-Contro y el pre-miR-204 y se pudo observar que después de 24 horas de incubación las células tumorales transfectadas con la secuencia scramble eran capaces de atravesar la capa de matrigel no así para las células que sobre expresan al miR-204 las cuales solo un pequeño número de células fue capaz de atravesar la capa de matrigel por lo cual podemos concluir que el miR-204 es capaz de regular migración e invasión celular en cáncer de

mama, estos datos son congruentes con los obtenidos por Imam y cols donde ellos encontraron que el miR-204 es capaz de inhibir migración e invasión celular *in vivo*.

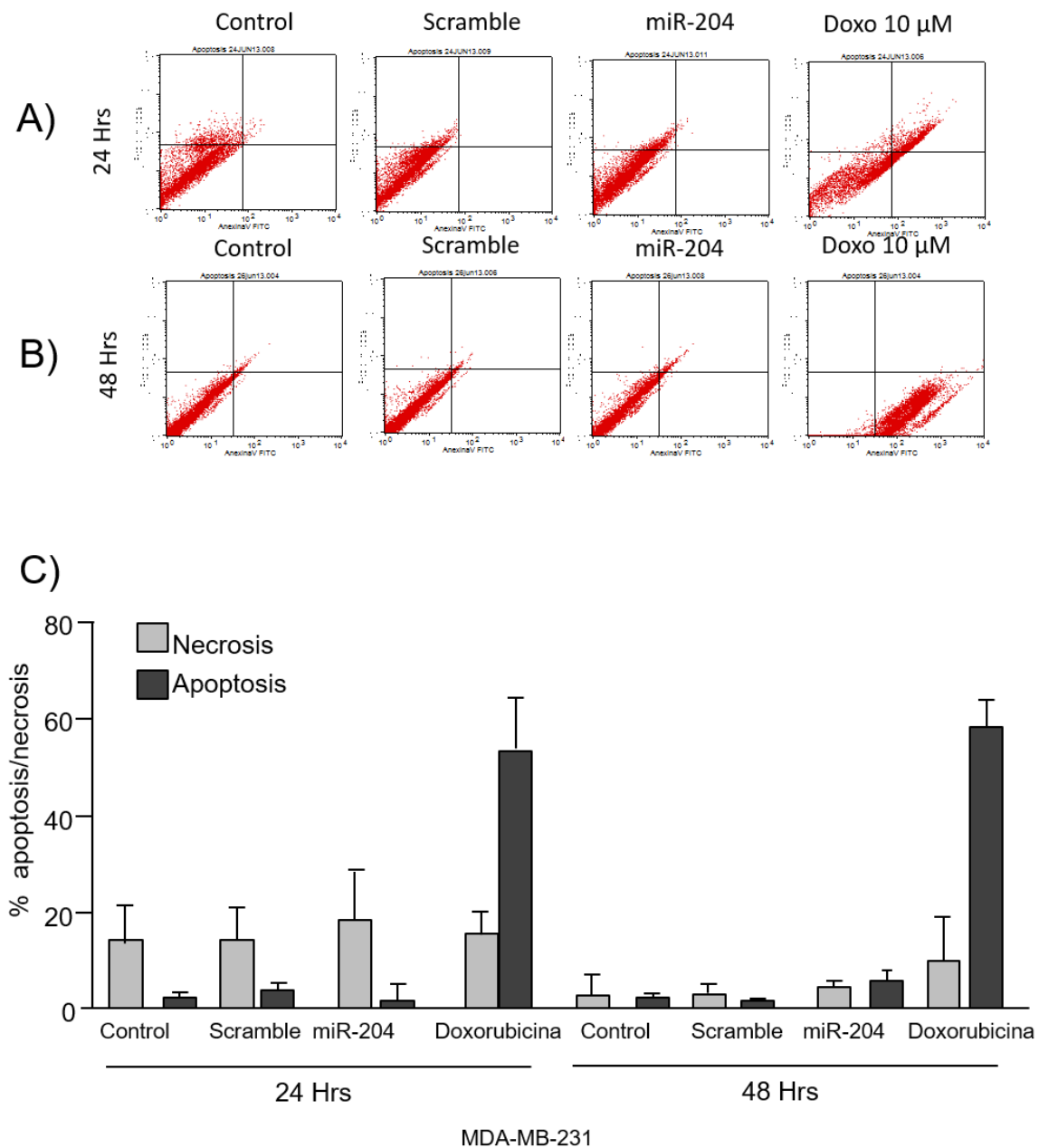


Figura 23. Efecto del miR-204 sobre la apoptosis. Análisis de apoptosis en células MDA-MB-231 transfectadas con premiR-204 y o scramble. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S $p < 0.05$

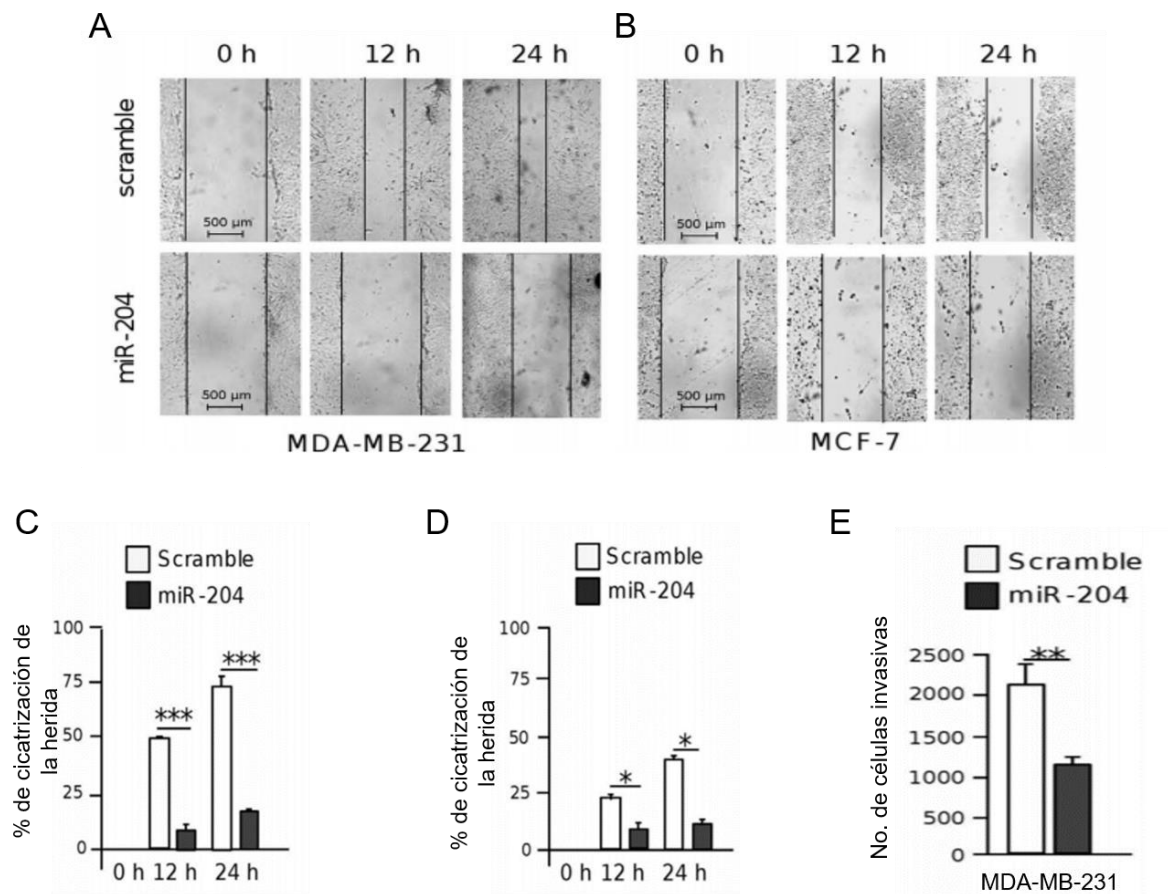


Figura 24. Efecto del miR-204 sobre la migración e invasión en cáncer de mama *in vitro*. análisis de migración mediante ensayo de wound healing en células MDA-MB-231 A) y MCF-7 B) representación gráfica de los ensayos de migración por wound healing C y D) ensayo de invasión mediante cámaras transwell en células MDA-MB-231.E). Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * < 0.01 ** < 0.005 ***

7. El miR-204 como modulador de la angiogénesis.

La angiogénesis es el proceso mediante el cual hay generación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. El proceso de angiogénesis es un proceso complejo donde participan un gran número de receptores, ligandos y factores de transcripción. Mediante el análisis del transcriptoma de la línea celular de cáncer de mama que sobre expresa al miR-204 se lograron identificar una serie de genes relacionados con angiogénesis, desarrollo y maduración de vasos sanguíneos, de entre los cuales destacan la ANGPT1, ANGPTL2, TGFBR1, CREB5, FGF1. Por lo cual con el objetivo de determinar el papel que juega el miR-204 en el proceso de angiogénesis se realizaron co-cultivos de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) con células MDA-MB-231 o MCF-7 transfectadas con el pre-miR-204 o el pre-miR-Neg-control sobre una capa de matriz extracelular de ratón. En la figura 25A y 25B se pueden observar las células MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente en monocultivo incubadas con medio de cultivo sin suero fetal bovino sobre matrigel durante 24 horas donde se puede observar que ambas líneas celulares no son capaces de desarrollar estructuras micro tubulares por sí mismas, de igual manera se cultivaron células HUVEC de manera individual en medio sin complementar, donde se pudo observar la formación de 0-2 estructuras tubulares en promedio figura 25C no así cuando a las células HUVEC en monocultivo se le adiciono VEGFA dicho factor indujo de manera importante la formación de túbulos alrededor promoviendo la formación de entre 15-18 túbulos en promedio figura 25D posteriormente tanto las células MDA-MB-231 como las

células MCF-7 fueron transfectadas con una secuencia scramble o con el precursor del miR-204 y fueron co-cultivadas con células HUVEC, después de 24 horas de co-cultivo se observó la formación de túbulos en los co-cultivos donde las células tumorales fueron transfectadas con el scramble figura 25E y D lo cual indica que las células tumorales son capaces de inducir la formación de microtubulos y demuestra su actividad angiogenica, de manera interesante cuando se realizaron co-cultivos de células HUVEC con celulas tumorales transfectadas con el pre-miR-204 para el caso de MDA-MB-231 se observó una completa inhibición en la formación de túbulos, de manera similar en los co-cultivos con células MCF-7 se observó una reducción importante en la formación de túbulos. Posteriormente, se realizaron monocultivos de células tumorales en donde se adición VEGFA donde pudimos observar que tanto las células MDA-MB-231 como las células MCF-7 no son capaces de formar por si solas microtubulos ya que al inducirlas con VEGFA , estas no son capaces de formar dichas estructuras. Por lo que podemos concluir que el miR-204 es capaz de inhibir la formación de micro túbulos y por lo tanto inhibir angiogénesis.

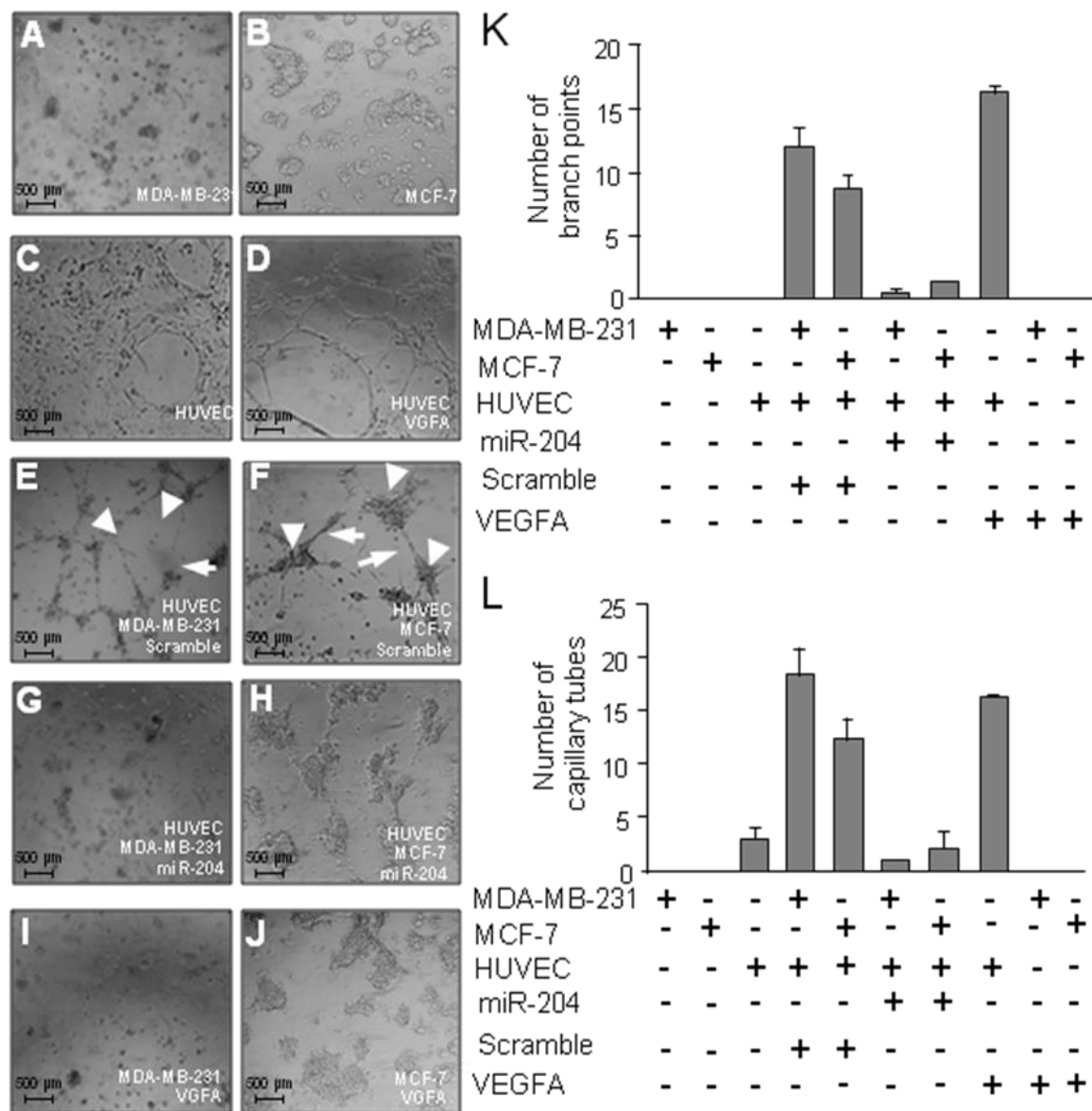


Figura 25. Efecto del miR-204 sobre la angiogénesis A) Células MDA-MB-231, B) Células MCF-7, C) Células HUVEC, D) Células HUVEC/VEGFA E) co-cultivo MDA-MB-231-scramble/HUVEC, F) co-cultivo MCF-7-scramble/HUVEC G)MDA-MB-231-premiR-204/HUVEC H) MCF-7-premiR-204/HUVEC I) células MDA-MB-231/VEGFA J) células MCF-7/VEGFA. Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * <0.01 ** <0.005 ***

Finalmente se analizó el efecto de la sobreexpresión del miR-204 sobre la angiogénesis *in vivo*, para estos se transfectaron células MDA-MB-231 con el premiR-204 o scramble, 48 h después de la transfección se las células fueron embebidas en matrigel y distribuidas en angioreactores esteriles, como control se utilizaron angioreactores en las cuales se adicionaron los factores proangiogenicos VGFA/FGF1, cada angioreactor fue colocado quirúrgicamente por duplicado en los flancos de ratones desnudos nu/nu (figura 26 A), 9 días después los angioreactores fueron retirados y se analizó la formación de vasos sanguíneos, como se puede observar en la figura 26B en los angioreactores que contenían las células MDA-MB-231 transfectadas con el Scramble, se puede observar la formación de vasos sanguíneos inmaduros los cuales aún no están vascularizados, de manera similar, los angioreactores a los cuales se les adicionaron los agentes proangiogenicos FGF1 y VEGFA mostraron la formación de vasos sanguíneos maduros e incluso vascularizados contrariamente, aquellos angioreactores en los cuales se embebieron células transfectadas con el premiR-204, no se logró observar la formación de vasos sanguíneos, para comprobar este resultado, los angioreactores fueron abiertos y la matrigel se disolvió y marco con FITC-lectina, la cual sirve para marcar células endoteliales, como se puede ver en la figura 26C los angioreactores que tenían células que expresaban al miR-204 presentan baja señal de fluorescencia, esto al comparar con la condición scramble y los angioreactores con FGF1/VEGFA

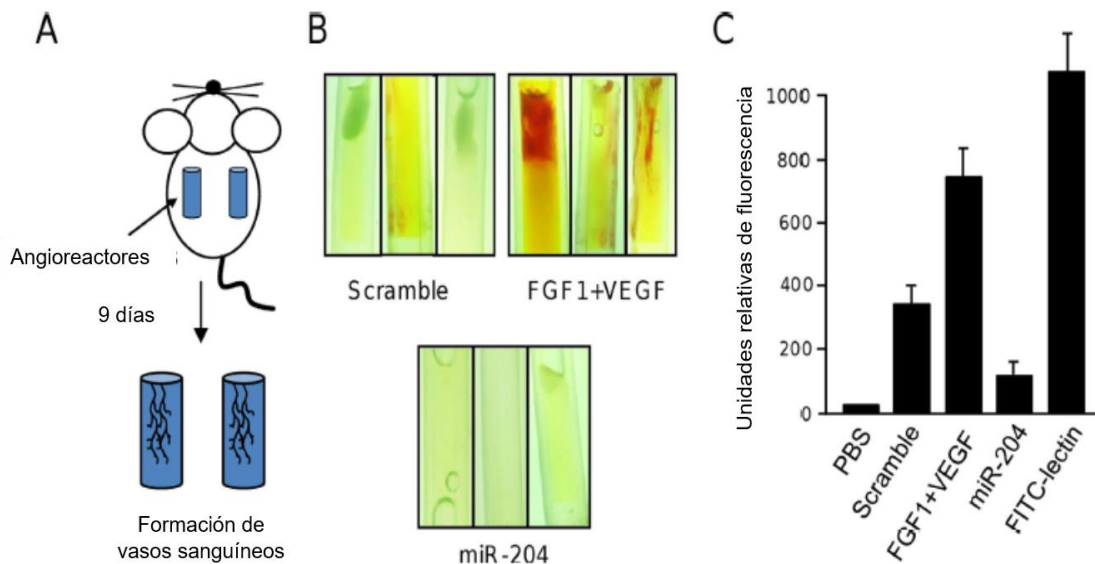


Figura 26. Efecto del miR-204 sobre la formación de vasos sangíneos *in vivo*. A) Diseño experimental de angiogénesis *in vivo* B) angioreactores retirado 9 días después de su implantación en ratones desnudos nu/nu, C) cuantificación de los vasos sanguíneos mediante tinción con FITC-lectina. Las barras representan la expresión promedio de tres experimentos independientes $\pm$ D.S $p < 0.05$.

8. Validación de genes blancos del miR-204 mediante ensayos de detección de actividad luciferasa.

Con el objetivo de validar a los genes ANGPT1, TGFBR2, SMAD4, CREB5 y MAPRE2 como blancos director del miR-204, inicialmente se realizó una búsqueda en la base de datos Target Scan, para determinar en qué posición se encuentran los sitios de unión para el miR-204 en la 3'UTR de cada gen. Una vez que obtuvimos este dato, se descargaron las secuencias correspondientes a los RNA mensajeros de cada gen y mediante la utilización del programa PrimerBlast se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de la 3' UTR de cada gen en el cual hubiera al menos un sitio de unión conservado para el miR-204. En la tabla 12 se muestran los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR. Una vez que se purificó y cuantificó de DNA total, se realizaron reacciones de PCR con el objetivo de amplificar los fragmentos correspondientes a secuencia 3'UTR de los genes ANGPT1, TGFBR2, SMAD4, CREB5 y MAPRE2. El DNA total utilizado para las reacciones de PCR fue extraído a partir sangre de 2 donadores sanos. En la figura 27 A se muestra un gel de agarosa al 2% donde se pueden observar los amplicones obtenidos mediante PCR, correspondientes a las 3'UTR de los genes ANGPT1, TGFBR2, SMAD4, CREB5 y MAPRE2, como se puede observar todos los amplicones corrieron en el tamaño esperado, posteriormente cada fragmento fue purificado a partir de banda, para generar extremos cohesivos en cada amplicon, se realizó una restricción enzimática con la enzimas SpeI y HindIII, cada amplicon restringido fue corrido en un gel de agarosa al 2 %, para posteriormente realizar purificaron a partir de

banda, los amplicones restringidos y purificados fueron clonados en el vector plasmidico pmiR-Report (Ambion). Se realizaron reacciones de transformación utilizando las reacciones de ligación, esto se realizó en células competentes *E. coli* DH5 α . Solo se obtuvieron colonias para las bacterias transformadas con las construcciones pmiR-TGFBR2, pmiR-ANGPT1 y p-miR-CREB5. Para determinar si las clonas bacterianas seleccionadas después de la clonación y transformación de bacterias contenían el inserto del tamaño esperado, cada una de las colonias obtenidas fueron picadas y analizadas por PCR utilizando los oligonucleótidos que empleamos para amplificar las secuencias 3'UTR respectivas, como se puede observar en la figura 27 B se obtuvieron amplicones correspondientes a los tamaños esperados en 3 de 3 colonias ANGPT1.1, y 2 de 2 colonias analizadas para CREB5 y TGFBR2 respectivamente. Finalmente se confirmó la integridad y veracidad de las secuencias clonadas en el vector plasmidico pmiR-report mediante secuenciación como se puede observar en la figura 27C.

Tabla 12 oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR de las 3'UTR de los genes CREB5, Mapre, ANGPT1, TGFBR2 y SMAD4.

Gen	Secuencia 5' - 3'	Amplicon bp
CREB5.1	Forward primer GGACTAGTTCTTCAAAGACTGGCTTTCATTTT Reverse primer CCCAAGCTTAAAGCACCAAAGCGTTTCCC	225
Mapre 2.1	Forward primer GGACTAGTTGCAAGTCTAACCTCTGAACA Reverse primer CCCAAGCTTATGTTTTCCCCCAGACACA	201
ANGPT1.1	Forward primer GGACTAGTCGTGAATCTGGAGCCGTTTG Reverse primer CCCAAGCTTAGTAGTTTGAAGCACAGCAAGC	141
TGFBR2.1	Forward primer GGACTAGTTGTCAGAGGATACTGTGGCTTG Reverse primer CCCAAGCTTTGAGTACAGCTGAAGTGTTCCAT	162
SMAD4.1	Forward primer GGACTAGTACACCCACCGTAAGACCTCA Reverse primer CCCAAGCTTTCTTTGTATACCAGGGGCGG	156

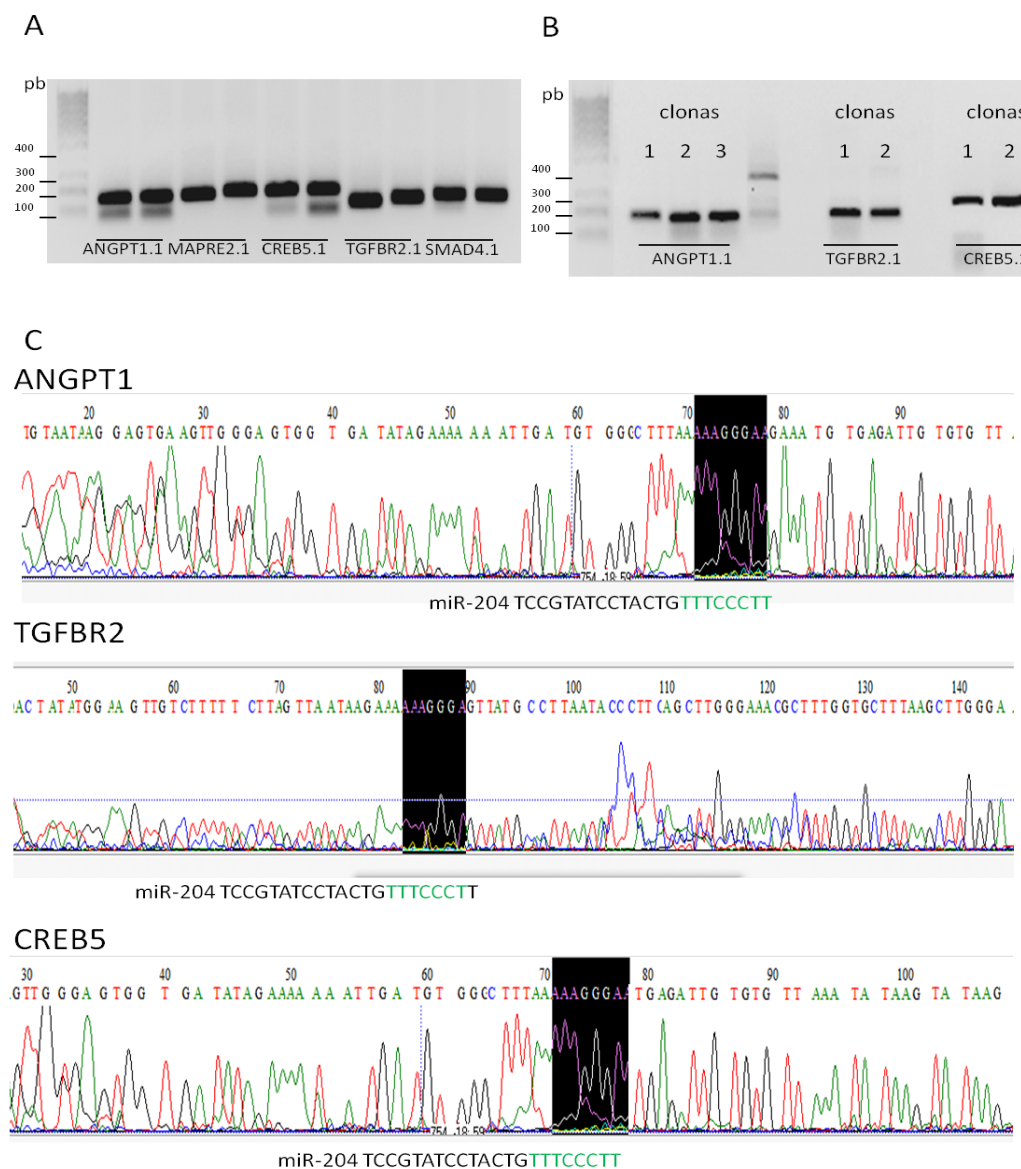


Figura 27. Clonación de los fragmentos 3'UTR en el plasmido pmiR-report. A) se muestra un gel de agarosa al 2% donde se pueden observar los amplicones obtenidos mediante PCR, correspondientes a las 3'UTR de los genes *angpt1*, *tgfb2*, *smad4*, *creb5* y *mapre2*. Análisis de clonas candidatas mediante PCR colony and validacion de las secuencias clonadas por secuenciación.

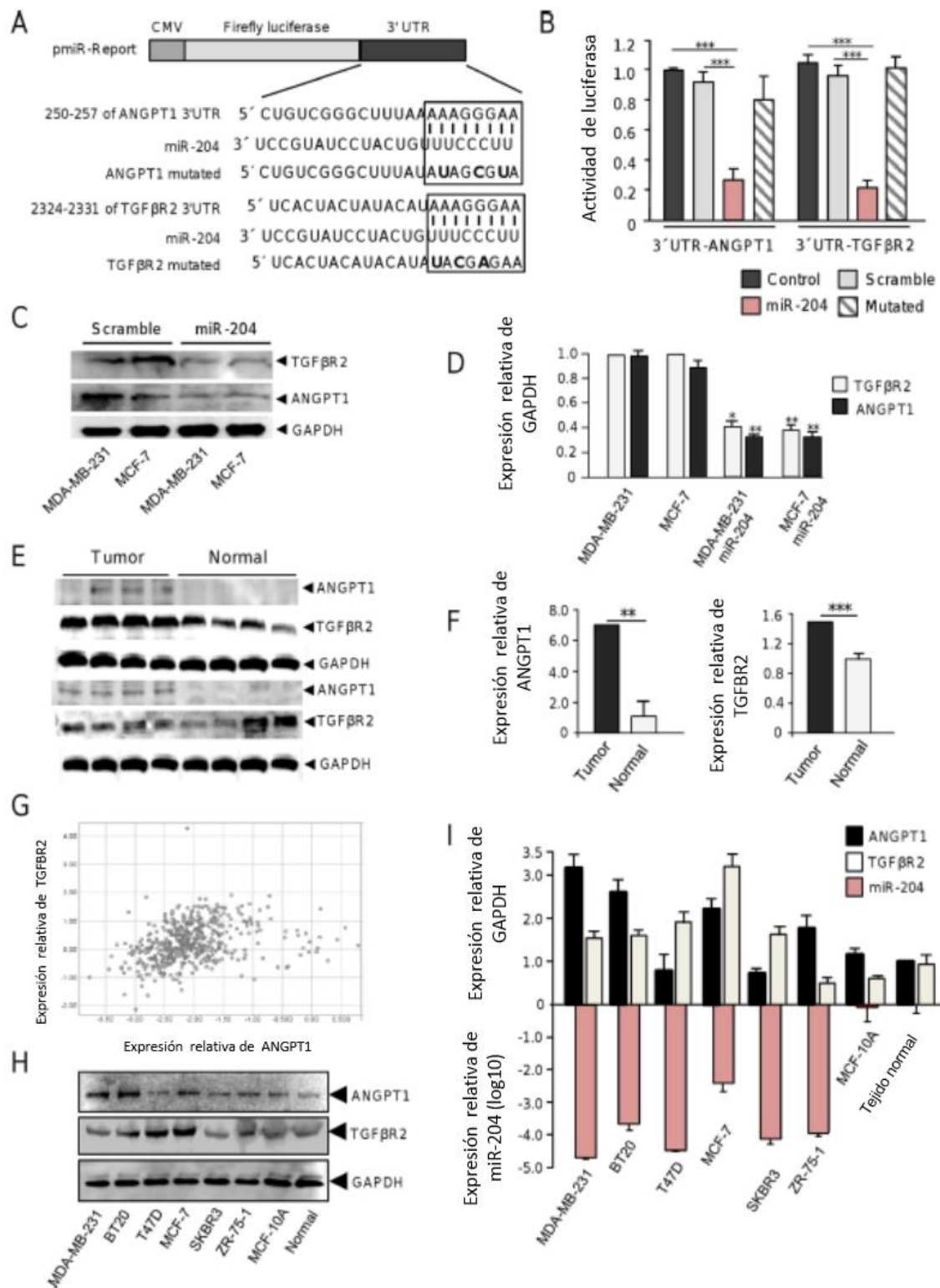


Figura 28. Validación de blancos del miR-204. A) esquema de las construcciones 3'UTR en el plasmido pmiR-report B) validacion de blancos mediante ensayo de luciferasa C) inmunodeteccion de las proteínas ANGPT1 y TGFBR2 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 trasnfectadas con el miR-204 en D) se muestra la densotimetria E)) inmunodeteccion de las proteínas ANGPT1 y TGFBR2 en un set de 8 biopsias de cáncer de mama y 8 biopsias de tejido mamario normal F) análisis densitometrico de la inmunodeteccion en cáncer de mama. G) anaisis in sililico de los datos reportados de expresión de ANGPT1 y TGFBR2 en cáncer de mama en el TCGA H) inmunodeteccion de las proteínas ANGPT1 y TGFBR2 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. I) análisis comparativo entre la expresión de ANGPT1 y TGFBR2 y la expresión del miR-204 en distintas líneas celulares de cáncer de mama. Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * <0.01 ** <0.005 ***

Adicionalmente se realizaron las construcciones pmiR-3'UTR-ANGPT1-mutated y pmiR-3'UTR-ANGPT1-mutated en las cuales se hicieron mutaciones en el sitio de unión del miR-204 en la 3' UTR de ambos genes. En la figura 28 A se muestra un esquema las estructuras pmiR-3'UTR. Para determinar si estos genes son efectivamente blancos del miR-204 se realizaron cotransfecciones en la línea celular MDA-MB-231, transfectándose primero de manera independiente las construcciones pmiR-3'UTR. Tanto las wild type como las mutadas, 24 después de la transfección se cotransfectó el premiR-204 o el scramble. Como se puede ver en la figura 28 B las células transfectadas con la construcción pmiR-3'UTR ANGPT1 o pmiR-3'UTR- TGFB2 al ser cotransfectadas con el premiR-204 muestran una disminución drástica en la actividad luciferasa, no así para la células con transfectadas con el premiR-204 y las construcciones pmiR-3'UTR-ANGPT1-mutated y pmiR-3'UTR-ANGPT1-mutated las cuales mostraron una actividad luciferasa similar al de las células control (construcciones pmiR-3'UTR-ANGPT1 o pmiR-3'UTR- TGFB2) y las células cotransfectadas con las construcciones pmiR-3'UTR ANGPT1 o pmiR-3'UTR- TGFB2 y el scramble.

Una vez que se validaron como mRNAs blanco directos del miR-204 a los genes ANGPT1 y TGFB2 se decidió analizar su expresión a nivel proteína mediante inmunodetección en las líneas celulares MDA-MB-231 transfectadas y sin transfectar, como se puede observar en la figura 28C tanto en la línea celular MDA-MB-231 como MCF-7, la expresión de las proteínas ANGPT1 y TGFB2 disminuye aproximadamente un 50% en presencia del miR-204, no así para las células que fueron transfectadas con el scramble, del mismo modo se analizaron

un set de 8 biopsias de tejido mamario tumoral y tejido mamario normal, mediante inmunodetección se determinó la expresión de las proteínas ANGPT1 y TGFBR2, donde se pudo observar (figura 28E) que en promedio hay una mayor expresión de ambas proteínas en las biopsias de tejido tumoral esto al comparar con las biopsias de tejido normal adyacente, este mismo comportamiento se observó al analizar los datos disponibles para estos genes en la base de datos TCGA. Finalmente con el objetivo de hacer una correlación entre la baja expresión del miR-204 y la sobre expresión de sus blancos directos ANGPT1 y TGFBR2, se analizó su expresión mediante inmunodetección en un set de 6 líneas celulares de cáncer de mama, una línea celular de mama no tumoral y un pool de 10 TMN, (figura 27H) donde podemos observar que en la mayoría de las líneas celulares ambas proteínas se sobreexpresan, esto correlaciona con la expresión del miR-204 (figura 28 I).

9. Silenciamiento de los genes *angpt1* y *tgfbr2* y su efecto sobre angiogénesis.

Hasta el momento se puede concluir que el miR-204 es capaz de inhibir el proceso de angiogénesis en las líneas celulares de cáncer de mama así mismo podemos concluir que los genes pro-angiogenicos TGFBR2 y ANGPT1 son blancos directos del miR-204, para determinar el papel que juegan estos genes en el proceso de angiogénesis se realizó el diseño de 2 secuencias interferentes para silenciar la expresión tanto de TGFBR2 como de ANGPT1 en la línea celular MDA-MB-231. Parás determinar la eficiencia del silenciamiento de las construcciones psilencer-ANGPT1.1, psilencer-ANGPT1.2 y psilencer-TGFBR2.1, psilencer-TGFBR2.2 se realizaron ensayos de inmunodetección en las línea celular MDAMB-231, en la figura 29 A se puede observar como la construcción psilencer-ANGPT1.2 disminuye la expresión de angiopoyetina 1 alrededor de un 80%, de manera similar la construcción psilencer-TGFBR2.1, redujo la exprecion de TGFBR2 hasta un 75% (figura 29B). Posteriormente se realizaron ensayos de co-cultivos de células HUVEC con MDA-MB-231 silenciadas para ANGPT1, TGFBR2 o ambas. Donde pudimos observar que en los co-cultivos donde se silenció ANGPT1 hay una un efecto sobre la formación de túbulos si bien no se inhibe totalmente como cuando se sobreexpresa al miR-204 se reduce de manera importante la formación de túbulos con respecto a co-cultivos de células tumorales que si expresan a ANGPT1 así mismo pudimos observar que la morfología de los túbulos era distinta observándose túbulos cortos y poco organizados con bajo número de puntos de ramificación o nodos , de manera similar observamos que al

silenciar TGFBR2 tanto el número de túbulos se reduce de manera importante observándose una morfología típica en los túbulos finalmente al silenciar ambas proteínas se abatió casi completamente la formación de túbulos incluso se observó aglomeramientos celulares aislados por lo cual podemos concluir que tanto las proteínas TGFBR2 como ANGPT1 juegan un papel importante en la formación de túbulos y por lo tanto en angiogénesis Figura 29 M y N. de manera interesante al analizar el efecto del silenciamiento de TGFBR2 sobre el proceso de proliferación celular, pudimos observar que al disminuir su expresión, hay un descenso en la proliferación celular, no así cuando se silencia ANGPT1 (Figura 29C), así mismo pudimos observar que el silenciamiento de TGFBR2 impacta drásticamente la migración celular, reduciéndola de manera significativa, por otro lado el silenciamiento de angpt1 disminuye la migración pero en un nivel menor (figura 29D)

Así mismo para comprobar el efecto de ANGPT1 y TGFBR2 sobre el proceso de angiogénesis, se realizaron ensayos de rescate, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el marco de lectura abierto (ORF) de ANGPT1 (NM_001146.4) y 2 pares de oligonucleótidos específico para amplificar el marco de lectura abierto (ORF) de TGFBR2 (NM_001024847.2). Las secuencias correspondientes a los ORFs tanto de ANGPT1 como de TGFBR2 fueron amplificadas a partir de cDNA y clonadas en el vector de expresión en mamíferos PCDNA 3, una vez que se comprobó la veracidad de las secuencias mediante secuenciación se transfectaron ambas construcción por separado en la línea celular MDA-MB-231, y se analizó la expresión de ANGPT1 y TGFBR2 por

inmunodetección. Donde la construcción pCDNA3-TGF β R2.2 y pCDNA3-ANGPT1.2 fueron las que generaron una mayor expresión de TGFBR2 y ANGPT1 respectivamente. (Figura 30 A y B) posteriormente se realizaron ensayos de angiogénesis por co-cultivos como se describieron anteriormente, para determinar el efecto de la sobreexpresión de ANGPT1 o TGFBR2 sobre la angiogénesis, primero las células tumorales fueron transfectadas con el premiR-204, 24-48 h después se co-transfectaron las construcciones pCDNA3-TGF β R2.2 o pCDNA3-ANGPT1.2 con el objetivo de recuperar la expresión de cada una de las proteínas, como podemos observar en la figura 30G al recuperar la expresión de la ANGPT1, se restablece de manera importante la formación de túbulos, esto al comparar con el co-cultivo de células HUVEC/MDA-MB-231 transfectadas con el premiR-204 donde se abatio por completo la formación de túbulos, por otro lado al recuperar la expresion del TGFBR2, se puede observar la inducción de túbulos, que aunque es mayor al del co-cultivo HUVEC/MDA-MB-231/miR-204, este el efecto es menor al visto en el co-cultivo HUVEC/MDA-MB-231/miR-204/ pCDNA3-ANGPT1.2. Por lo que se puede concluir que el ANGPT1 y TGFBR2 juegan un papel importante en la inducción de angiogénesis tumoral.

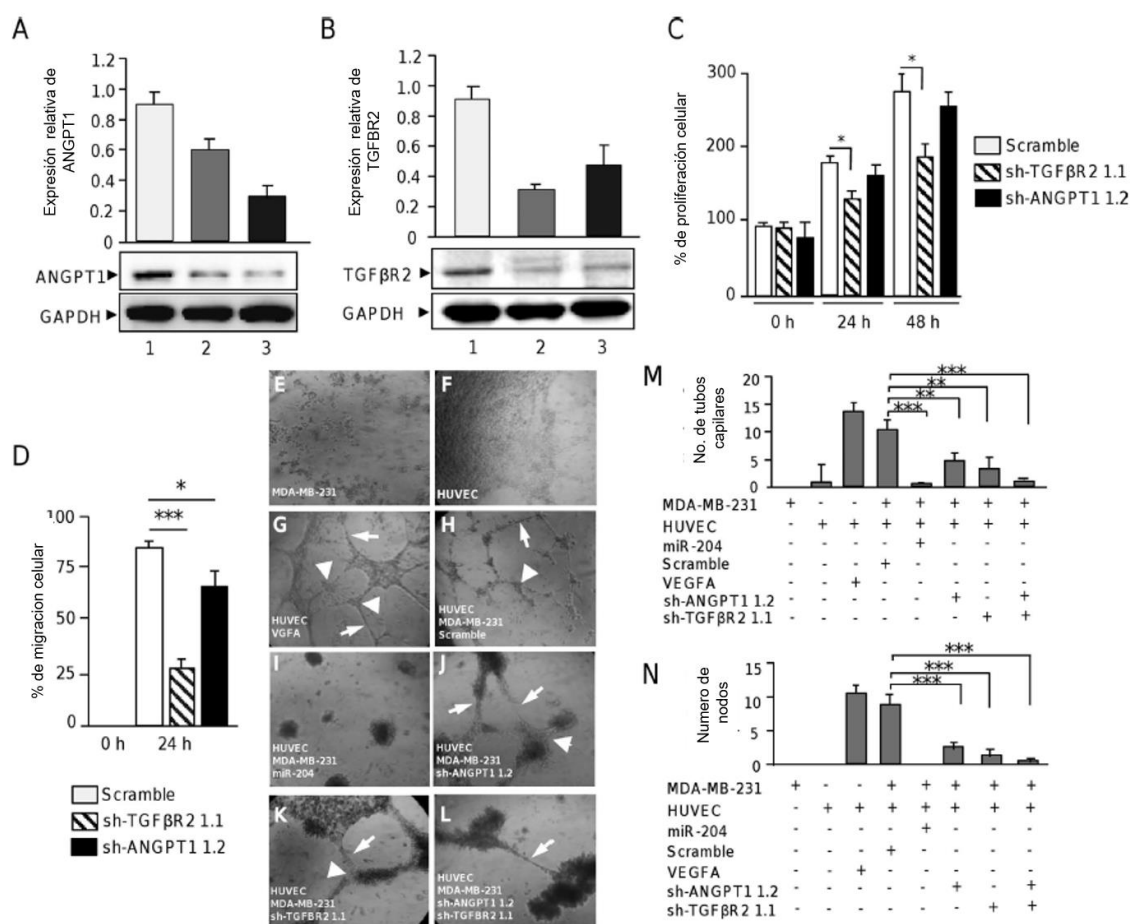


Figura 29. Silenciamiento de *angpt1* y *tgfr2* y su efecto sobre la angiogénesis tumoral. A) Silenciamiento de *ANGPT1* en la línea celular MDA-MB-231, B) silenciamiento de *TGFBR2* en la línea celular MDA-MB-231, C) efecto del silenciamiento de *ANGPT1* y *TGFBR2* sobre la proliferación celular, D) efecto del silenciamiento de *ANGPT1* y *TGFBR2* sobre la migración celular E-L) efecto del silenciamiento de *ANGPT1* y *TGFBR2* en la línea celular MDA-MB-231. Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * < 0.01 ** < 0.005 ***

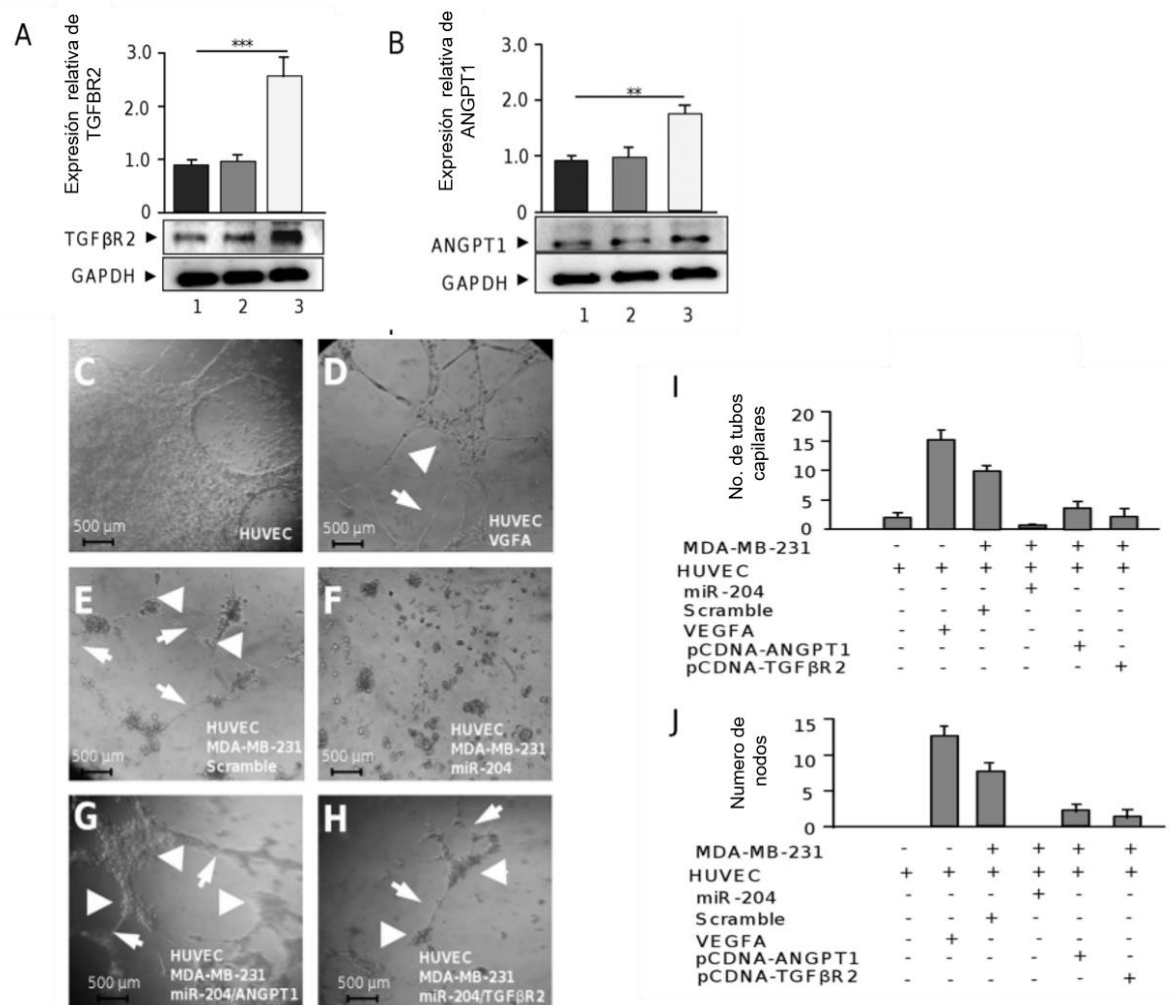


Figura 30. Efecto del rescate de la expresión de ANGPT1 y TGFBR2 sobre la inducción de la angiogénesis tumoral. Sobreexpresión de ANGPT1 1 y TGFBR2 mediante la transfección de las construcciones pCDNA3-ANGPT1.2 A) y pCDNA3-TGFBR2.2 B) ensayo de angiogénesis mediante co-cultivos MDA-MB-231/HUVEC C-H) cuantificación de la formación de túbulos I) cuantificación de la formación de nodos o ramificaciones. Los ensayos se realizaron por triplicados, $p < 0.05$ * < 0.01 ** < 0.005 ***

VI. Discusión

En nuestro laboratorio previamente se realizó el análisis del miRNoma de un set de 9 tumores mamarios ductales, en donde se encontraron 54 miRNAs con expresión diferencial con respecto a los tejidos mamarios normales analizados. de manera interesante se observó que el miR-204 se encontró consistentemente reprimido en todos los tumores de mama analizados, por lo cual podría estar involucrado en el desarrollo y progresión del CM. Existen pocos reportes acerca de la función del miR-204 en cáncer y solo uno de ellos ha sido reportado recientemente en CM por lo que su análisis funcional resulta interesante, razón por la cual se propuso abordar su estudio en el presente proyecto, esto aunado a que existen varios reportes en los cuales se ha observado que el miR-204 se encuentra desregulado (reprimido) en distintos tipos de cáncer [92-93, 103-111], de manera congruente con lo reportado en otras neoplasias, al analizar la expresión del miR-204 en un panel de 58 biopsias de tejido mamario tumoral pudimos observar que el miR-204 se encuentra reprimido en la mayoría de las biopsias de cáncer de mama, no así en las biopsias de tejido mamario normal que fueron analizadas (26 biopsias de tejido normal adyacente 9). Este resultado fue confirmado al analizar los datos reportados en el TCGA para un set de 776 muestras pareadas de cáncer de mama donde se puede observar que el miR-204 se encuentra reprimido en casi todas las biopsias tumorales este resultado es congruente con lo reportado por Imam JS (2014) y Lee H (2016), los cuales reportaron recientemente que el miR-204 se encontraba reprimido en cáncer de mama. una vez que se obtuvimos este resultado, quisimos hacer una correlación

entre la baja expresión del miR-204 y algunos datos clínicos como son estadio clínico, expresión de receptores HER2, ER y PR, o subtipo clínico luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo, sin embargo se observó que no existe una correlación entre la baja expresión del miR-204 y los datos clínicos ya mencionados, por lo que se pudo concluir que desregulación en la expresión del miR-204 es un evento que ocurre desde etapas tempranas en el desarrollo del cáncer de mama y que es independiente del estatus de receptores hormonales.

Posteriormente con el objetivo de dilucidar cuáles son las rutas potencialmente moduladas por el miR-204 así como identificar los genes modulados de manera directa o indirecta por el miR-204 se realizó el análisis del transcriptoma de células MDA-MB-231 de cáncer de mama las cuales expresaban de manera ectópica al miR-204, como ya se ha mencionado, del análisis del transcriptoma se obtuvo un gran número de genes que participan principalmente en los procesos de proliferación, migración y angiogénesis entre otros, resultando particularmente interesantes CREB5, ARHGAP5, FOXC1, MAPRE2, RAB22A, SMAD4, ANGPT1, FGF1 y ANPTL2.

Con base en reportes anteriores se sabe que el miR-204 es capaz de regular procesos importantes en el desarrollo de cáncer, como son proliferación y migración celular¹¹⁰⁻¹¹³ lo cual es congruente con los resultados obtenidos, estos procesos podrían ser regulados por blancos directos del miR-204 como son CREB5 el cual ha sido relacionado con proliferación celular, migración y supervivencia celular en cáncer pulmonar y leucemia. (Tan et al 2012, Sakamoto

et al. 2010) y los genes TGFBR2 y SMAD4 los cuales poseen 1 y 2 sitios conservados de unión al miR-204 y que fueron validados por primera vez como blancos del miR-204 en este trabajo, y que se ha visto que poseen un papel dual en cáncer ya que mientras TGFBR2 participa como supresor de tumor en etapas tempranas de cáncer, se ha observado que en etapas tardías juega un papel de oncogén, la superfamilia TGF β es relevante en la proliferación migración y angiogénesis en cáncer, así como los ligandos BMP, TGF β y activina los cuales se unen a receptores de tipo II (BMPRII, TGF β RI, TGF β RII y ActR-II) activando genes que regulan angiogénesis migración y proliferación. De manera notable, no existen reportes donde se describa el papel que juegan los microRNAs en la regulación de TGFBR2 y SMAD4 en la angiogénesis en cáncer de mama. mediante predicciones en bases de datos encontramos que ambos genes poseen 1 y 2 sitios de unión al miR-204, respectivamente, por lo que fueron elegidos como candidatos para su caracterización en el presente proyecto, de manera congruente cuando se analizó el transcriptoma de células de cáncer de mama que expresaban ectópicamente al miR-204 estos posibles blancos (ANGPT, TGFBR2, SMAD4, CREB5) resultaron reprimidos en su expresión. Por otra parte se ha reportado previamente que en cáncer la sobreexpresión de ANGPT1 y VEGF1 se ha relacionado con la formación de vasos sanguíneos en tumores esofágicos, mostrando que la expresión de ANGPT1 se asocia con la neo-vascularización mediada por VEGF (Huang et al 2009, Park, Yu, et al 2006). También ha sido reportado que la inhibición de la expresión de ANGPT1 mediante silenciamiento disminuye la angiogénesis, la proliferación celular y la activación de la apoptosis *in*

vivo. Sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de la ANGPT1 en diferentes tipos tumorales genera resultados divergentes, restringiendo la angiogénesis en algunos sistemas mientras que promueve angiogénesis en otros, por lo cual se planteó la teoría de que el efecto de Angpt1/Tie1 pudiera ser contexto-dependiente. Algunos trabajos han demostrado que la sobreexpresión de la ANGPT1 restringe crecimiento celular y angiogénesis en cáncer de colon, no así para cáncer cervical, glioma y cáncer gástrico donde se ha observado una correlación entre la sobreexpresión de VEGF, PDGF y TGFB1 y progresión y angiogénesis tumoral, nosotros encontramos mediante análisis bioinformático que ANGPT1 posee 3 sitios de unión para el miR-204 además que encontramos mediante análisis de microarreglos en células que sobreexpresan al miR-204 que su expresión estaba reprimida, por lo cual de análisis mediante ensayos de reporteros 3'UTR LUC si ANGPT1 es blanco directo del miR-204 y no solo eso, se logró demostrar mediante ensayo de silenciamiento y rescate que la angiopoyetina 1 juega un papel central en la inducción de angiogénesis en cáncer de mama regulado por el miR-204 lo cual es congruente con reportes previos donde se analiza el papel que juega el miR-204 en la regulación del proceso de neovascularización en cáncer cervical, cáncer cerebral y en células de la retina y cristalino ocular (Ying et al 2013, Lam 2011, Conte 2010, Shaham 2013).

Finalmente con todos los datos obtenidos pudimos construir un modelo (figura 31) en el cual se plantea que por un lado el miR-204 es capaz de modular proliferación y migración celular a través de la regulación negativa de TGFBR2, el cual se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama, por otro lado el proceso de

angiogénesis es mediado por la regulación dual de *angpt1* y *tgfb β 2*, ya que al sobreexpresar de manera ectópica al miR-204 en una línea celular de cáncer de mama, esta dejara de sobreexpresar ANGPT1 y no podrá liberarla al medio extracelular para inducir angiogénesis disminuyendo así la señalización de una de las principales vías de inducción de angiogenesis, sumado a esto, al haber de nueva cuenta expresión del miR-204, este será capaz de unirse al mRNA de *tgfb β 2* y disminuir su expresión, por lo que los mecanismos de angiogenesis dependientes de la ruta TGF β se verán drásticamente afectadas inhibiéndose así el proceso de angiogénesis tumoral.

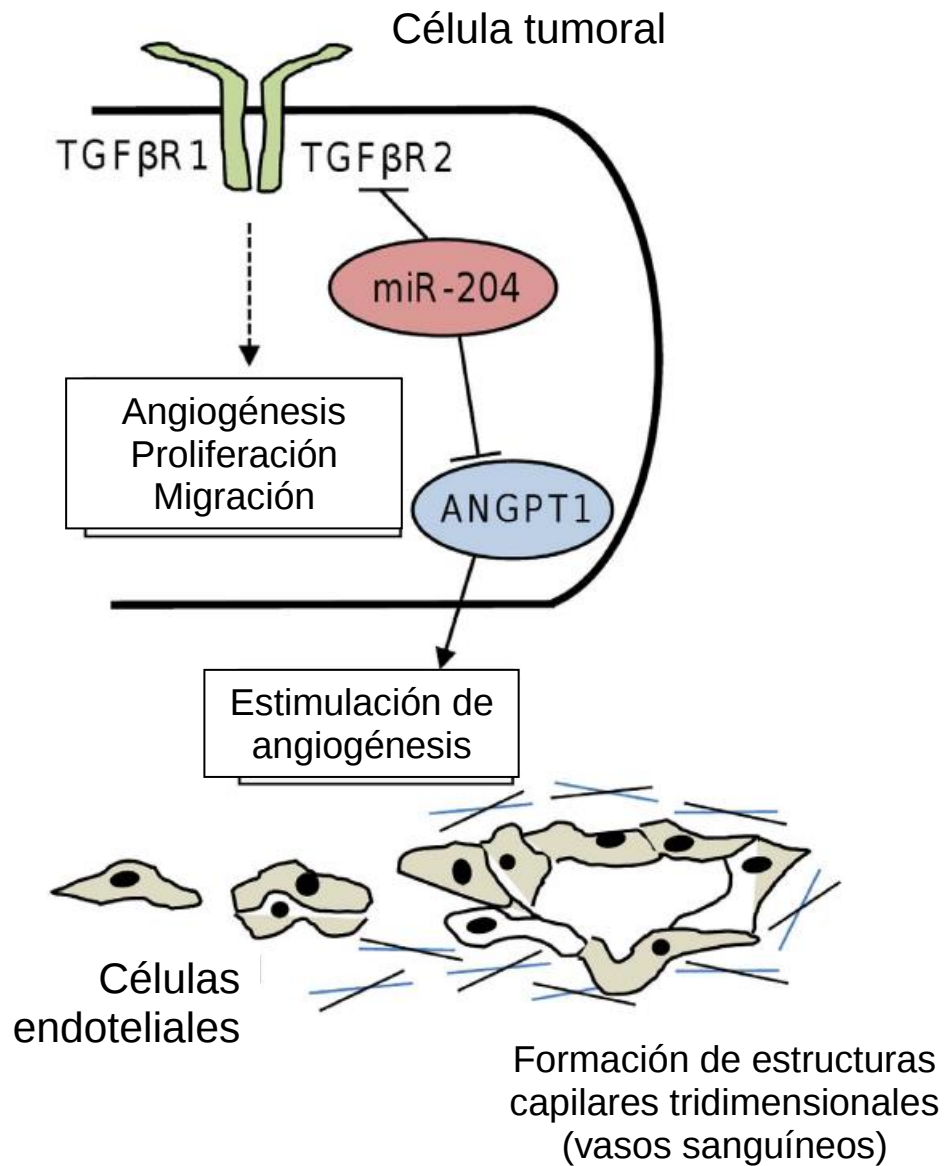


Figura 31. Modelo de la regulación de la proliferación, migración y angiogénesis medidas por el miR-204 en cáncer de mama.

VII. Conclusiones

1. El miR-204 se encuentra reprimido en cáncer de mama.
2. No hay correlación entre la baja expresión del miR-204 y estadio clínico, subtipo tumoral y expresión de receptores ER, PR y HER2.
3. El miR-204 no genera cambios en la viabilidad celular
4. El miR-204 no induce apoptosis por si mismo.
5. El miR-204 regula de manera negativa el proceso de proliferación celular *in vitro*
6. El miR-204 disminuye la migración e invasión celular *in vitro*
7. Se validaron como nuevos blancos del miR-204 a los genes CREB5, ANGPT1 y TGFBR2.
8. El miR-204 inhibe el proceso de angiogénesis *in vivo* e *in vitro*
9. La regulación de la angiogénesis *in vitro* es mediada por los genes ANGPT1 y TGFBR2.

VIII. ARTICULOS PUBLICADOS.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer

Received: 15 February 2016
Accepted: 15 September 2016
Published: 05 October 2016

Ali Flores-Pérez¹, Laurence A. Marchat², Sergio Rodríguez-Cuevas³, Verónica Bautista-Piña³, Alfredo Hidalgo-Miranda⁴, Elena Aréchaga Ocampo⁵, Mónica Sierra Martínez⁶, Carlos Palma-Flores⁷, Miguel A. Fonseca-Sánchez⁷, Horacio Astudillo-de la Vega⁸, Erika Ruiz-García⁹, Juan Antonio González-Barrios¹⁰, Carlos Pérez-Plasencia¹¹, María L. Streber¹² & César López-Camarillo¹

Deregulated expression of microRNAs has been associated with angiogenesis. Studying the miRNome of locally advanced breast tumors we unsuspectedly found a dramatically repression of miR-204, a small non-coding RNA with no previous involvement in tumor angiogenesis. Downregulation of miR-204 was confirmed in an independent cohort of patients and breast cancer cell lines. Gain-of-function analysis indicates that ectopic expression of miR-204 impairs cell proliferation, anchorage-independent growth, migration, invasion, and the formation of 3D capillary networks *in vitro*. Likewise, *in vivo* vascularization and angiogenesis were suppressed by miR-204 in a nude mice model. Genome-wide profiling of MDA-MB-231 cells expressing miR-204 revealed changes in the expression of hundred cancer-related genes. Of these, we focused on the study of pro-angiogenic ANGPT1 and TGFBR2. Functional analysis using luciferase reporter and rescue assays confirmed that ANGPT1 and TGFBR2 are novel effectors downstream of miR-204. Accordingly, an inverse correlation between miR-204 and ANGPT1/TGFBR2 expression was found in breast tumors. Knockdown of TGFBR2, but not ANGPT1, impairs cell proliferation and migration whereas inhibition of both genes inhibits angiogenesis. Taken altogether, our findings reveal a novel role for miR-204/ANGPT1/TGFBR2 axis in tumor angiogenesis. We propose that therapeutic manipulation of miR-204 levels may represent a promising approach in breast cancer.

Over the last decade, microRNAs (miRNAs) have emerged as a prominent class of novel negative regulators of gene expression¹. These non-coding single-stranded RNAs are evolutionary conserved, and function as guide molecules in posttranscriptional gene silencing by partially complementing with the 3' untranslated region (UTR) of the target, resulting in mRNA degradation or translational repression². Remarkably, aberrant expression of miRNAs may contribute to development of diverse neoplasia and in some cases correlates with clinical-pathological features of tumors representing potential prognostic markers and novel therapeutic targets in cancer³. One mechanism by which miRNAs may induce tumorigenesis is by affecting the production of

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Ciudad de México, México. ²Programa en Biomedicina Molecular y Red de Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. ³Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM, Ciudad de México, México. ⁴Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México. ⁵Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Hospital Juárez, Ciudad de México, México. ⁶Departamento de Genética Humana, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Ciudad de México, México. ⁷Laboratorio de Investigación en Cáncer Translacional y Terapia Celular, Centro Médico Siglo XXI, Ciudad de México, México. ⁸Laboratorio de Medicina Translacional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México. ⁹Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1 de Octubre ISSSTE, Ciudad de México, México. ¹⁰Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México. ¹¹Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, FES-Itzamal, UBIMED, Tlaxiapa, Estado de México, México. ¹²Laboratorio de Investigación Experimental y Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L.-C. (email: genomicas@yahoo.com.mx)

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Suppression of cell migration is promoted by miR-944 through targeting of SIAH1 and PTP4A1 in breast cancer cells

Ali Flores-Pérez¹, Laurence A. Marchat², Sergio Rodríguez-Cuevas³, Verónica Piña Bautista³, Lizeth Fuentes-Mera⁴, Diana Romero-Zamora¹, Anabel Maciel-Domínguez¹, Olga Hernández de la Cruz¹, Miguel Fonseca-Sánchez¹, Erika Ruiz-García⁵, Horacio Astudillo-de la Vega⁵ and César López-Camarillo^{1,2*}

Abstract

Background: Aberrant expression of microRNAs has been associated with migration of tumor cells. In this study, we aimed to investigate the biological significance of miR-944 whose function is unknown in breast cancer.

Methods: miR-944 expression in breast cancer cells and tumors was evaluated by Taqman qRT-PCR assays. Transcriptional profiling of MDA-MB-231 cells expressing miR-944 was performed using DNA microarrays. Cell viability, migration and invasion were assessed by MTT, scratch/wound-healing and transwell chamber assays, respectively. The luciferase reporter assay was used to evaluate targeting of SIAH1, PTP4A1 and PRKCA genes by miR-944. SIAH1 protein levels were measured by Western blot. Silencing of SIAH1 gene was performed by RNA interference using shRNAs.

Results: Our data showed that miR-944 expression was severely repressed in clinical specimens and breast cancer cell lines. Suppression of miR-944 levels was independent of hormonal status and metastatic potential of breast cancer cells. Gain-of-function analysis indicated that miR-944 altered the actin cytoskeleton dynamics and impaired cell migration and invasion. Genome-wide transcriptional profiling of MDA-MB-231 cells that ectopically express miR-944 showed that 15 genes involved in migration were significantly repressed. Notably, luciferase reporter assays confirmed the ability of miR-944 to bind the 3'UTR of SIAH1 and PTP4A1 genes, but not PRKCA gene. Congruently, an inverse correlation between miR-944 and SIAH1 protein expression was found in breast cancer cells. Moreover, SIAH1 was upregulated in 75 % of miR-944-deficient breast tumors. Finally, SIAH1 gene silencing by RNA interference significantly impaired cell migration of breast cancer cells.

Conclusions: Our results pointed out that miR-944 is a novel upstream negative regulator of SIAH1 and PTP4A1 genes and provided for the first time evidence for its functional role in migration and invasion of breast cancer cells. They also suggest that miR-944 restoration may represent a potential strategy for breast cancer therapy.

Keywords: Breast cancer, miR-944, Migration, Invasion, Actin cytoskeleton, SIAH1, PTP4A1

* Correspondence: genomicas@uhsos.com.mx

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas, Ciudad de México, México

²San Lorenzo 293, Col. Del Valle, CP 03100, Mexico City, México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Research Article

Differential proteomic analysis reveals that EGCG inhibits HDGF and activates apoptosis to increase the sensitivity of non-small cells lung cancer to chemotherapy

Ali Flores-Pérez, Laurence A. Marchat, Lidia López Sánchez, Diana Romero-Zamora, Elena Arechaga-Ocampo, Nayeli Ramírez-Torres, José Díaz Chávez, Ángeles Carlos-Reyes, Horacio Astudillo-de la Vega, Erika Ruiz-García, Abrahan González-Pérez, César López-Camarillo 

First published: 14 September 2015 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/prca.201500008 [View/save citation](#)

Cited by: 1 article  [Citation tools](#)

Volume 10, Issue 2
February 2016
Pages 172–182



[View issue TOC](#)
Special Issue:
Proteomics and HIV

Abstract

Purpose

To search for regulated proteins in response to green tea (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in A549 lung cancer cells.

Experimental design

2DE and ESI/multistage MS (ESI-MS/MS) were performed to identify modulated proteins in A549 cells treated with EGCG. Cell migration was evaluated by transwell assays. RNA interference was used to silence the hepatoma-derived growth factor (HDGF). Caspase-3, caspase-9, and HDGF were immunodetected by Western blot assays. Flow cytometry was used for detection of mitochondrial membrane potential and apoptosis.

Results

We found that HDGF expression was threefold suppressed by EGCG treatment. Downregulation of HDGF by EGCG was confirmed using anti-HDGF antibodies in three lung cancer cell lines. EGCG treatment and HDGF abrogation by RNA interference resulted in a decreased migration of A549 cells. In addition, EGCG induced a marked synergistic effect with cisplatin in cell death. Consistently, an enhanced cytotoxicity in HDGF-silenced cells was also found. Cell death was associated to increased apoptosis, disruption of the mitochondrial membrane potential, and activation of caspase-3 and caspase-9.

RAD50 targeting impairs DNA damage response and sensitizes human breast cancer cells to cisplatin therapy

Ali Flores-Pérez², Lourdes E. Rafaeli², Nayeli Ramírez-Torres², Elena Aréchaga-Ocampo², Sara Frías^{1,4},
Silvia Sánchez⁴, Laurence A. Marchat², Alfredo Hidalgo-Miranda⁵, Valeria Quintanar-Jurado⁶, Sergio Rodríguez-Cuevas⁶,
Verónica Bautista-Piña⁶, Ángeles Carlos-Reyes², and César López-Camarillo^{1,4}

¹Oncogenomics and Cancer Proteomics Laboratory; Genomics Sciences Program, Autonomous University of Mexico City; Mexico DF, Mexico; ²Urea and Cancer Laboratory; National Institute of Cancerology; Mexico DF, Mexico; ³National Institute of Pediatrics; Biomedical Research Institute; National Autonomous University of Mexico; Mexico DF, Mexico; ⁴Molecular Biomedicine Program and Biotechnology Network; National School of Medicine and Homeopathy; National Polytechnic Institute; Mexico DF, Mexico; ⁵Cancer Genomics Laboratory; National Institute of Genomic Medicine; Mexico DF, Mexico; ⁶Institute of Breast Diseases; FUCAM; Mexico DF, Mexico; ⁷Lung Cancer Laboratory; National Institute of Respiratory Diseases; Mexico DF, Mexico

Keywords: breast cancer, RAD50 targeting, DNA damage, histone H2AX, chromosomal aberrations, chemosensitization, cisplatin, paclitaxel, doxorubicin

In tumor cells the effectiveness of anti-neoplastic agents that cause cell death by induction of DNA damage is influenced by DNA repair activity. RAD50 protein plays key roles in DNA double strand breaks repair (DSBR), which is crucial to safeguard genome integrity and sustain tumor suppression. However, its role as a potential therapeutic target has not been addressed in breast cancer. Our aim in the present study was to analyze the expression of RAD50 protein in breast tumors, and evaluate the effects of RAD50-targeted inhibition on the cytotoxicity exerted by cisplatin and anthracycline and taxane-based therapies in breast cancer cells. Immunohistochemistry assays on tissue microarrays indicate that the strong staining intensity of RAD50 was reduced in 14% of breast carcinomas in comparison with normal tissues. Remarkably, RAD50 silencing by RNA interference significantly enhanced the cytotoxicity of cisplatin. Combinations of cisplatin with doxorubicin and paclitaxel drugs induced synergistic effects in early cell death of RAD50-deficient MCF-7, SKBR3, and T47D breast cancer cells. Furthermore, we found an increase in the number of DSBRs, and delayed phosphorylation of histone H2AX after cisplatin treatment in RAD50-silenced cells. These cellular events were associated to a dramatical increase in the frequency of chromosomal aberrations and a decrease of cell number in metaphase. In conclusion, our data showed that RAD50 abrogation impairs DNA damage response and sensitizes breast cancer cells to cisplatin-combined therapies. We propose that the development and use of inhibitors to manipulate RAD50 levels might represent a promising strategy to sensitize breast cancer cells to DNA damaging agents.

Introduction

DNA-damaging drugs represent one of the main treatment strategies in human cancer.¹ Platinum-based agents such as cisplatin, and taxanes including doxorubicin and paclitaxel, are the mainstay of chemotherapy for ovarian, testicular, esophageal, stomach, bladder, lung, breast, and head and neck cancers.^{2,3} These drugs function as DNA damaging agents, topoisomerase inhibitors, and microtubules stabilizers thereby interfering with the ability of cancer cells to divide and survive.⁴ Particularly, cisplatin is a bi-functional agent, which forms intra-chain and inter-chain bonds in DNA strands generating double strand breaks (DSBRs). At the cellular level, cisplatin causes inhibition of DNA replication and transcription, cell cycle arrest and apoptosis-induced cell death.⁵ However, DNA damage produced by cisplatin does not always result in killing

cells, because several distinct cellular responses conducing to enhanced DNA repair are activated to overcome the genotoxic insults.^{6,7} Importantly, DNA damage response is not only activated in response to chemotherapy; it has been established that proper activation of DNA damage repair represents a biological anti-cancer barrier in human pre-cancerous lesions in early stages of tumorigenesis.^{8,9}

The effectiveness of anti-cancer agents that act causing extensive DSBR and cell death is largely influenced by DNA repair pathways. In tumor cells, enhanced DNA repair induces chemoresistance preventing the accumulation of lethal DNA damage from cytotoxic agents.⁷ These observations provided the basis for the use of DNA repair inhibitors to improve the therapeutic effects of DNA-damaging drugs.^{10,11} Homologous recombination and non-homologous end joining represent key cellular mechanisms to repair DNA damage. The heterotrimeric MRE11-RAD50-NBS1

*Correspondence to: César López-Camarillo; Email: genomicad@yahoo.com.mx
Submitted: 10/25/2013; Revised: 03/04/2014; Accepted: 01/16/2014; Published Online: 01/16/2014
<http://dx.doi.org/10.4161/cbt.28551>

RESEARCH ARTICLE

Methylation Landscape of Human Breast Cancer Cells in Response to Dietary Compound Resveratrol

Rubiceli Medina-Aguilar¹, Carlos Pérez-Pisencia², Laurence A. Marchat³, Patricio Gariglio¹, Jaime García Mena¹, Sergio Rodríguez Cuevas⁴, Erika Ruiz-García⁴, Horacio Astudillo-de la Vega⁴, Jennifer Hernández Juárez⁴, Ali Flores-Pérez⁵, César López-Camarillo^{6*}



1 Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México, **2** Laboratorio de Genética Funcional, Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala UNAM, Tlaxtepec, Estado de México, México, **3** Programa en Biomedicina Molecular y Red de Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, **4** Instituto de Enfermedades de la Mama, FUCAM, Ciudad de México, México, **5** Laboratorio de Medicina Translacional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México, **6** Laboratorio de Investigación en Cáncer y Terapia Celular, Hospital de Oncología, Centro Médico Siglo XXI, Ciudad de México, México, **7** Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Ciudad de México, México

* genomicas@yahoo.com.mx

OPEN ACCESS

Citation: Medina-Aguilar R, Pérez-Pisencia C, Marchat LA, Gariglio P, García Mena J, Rodríguez Cuevas S, et al. (2016) Methylation Landscape of Human Breast Cancer Cells in Response to Dietary Compound Resveratrol. *PLoS ONE* 11(6): e0157866. doi:10.1371/journal.pone.0157866

Editor: Javier S. Castresana, University of Navarra, SPAIN

Received: March 14, 2016

Accepted: June 6, 2016

Published: June 29, 2016

Copyright: © 2016 Medina-Aguilar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors acknowledge CONACYT SALUD for support of this work (233370 and 222305 grants). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Rubiceli Medina was supported by a CONACYT fellowship. The authors also thank Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) for support.

Abstract

Aberrant DNA methylation is a frequent epigenetic alteration in cancer cells that has emerged as a pivotal mechanism for tumorigenesis. Accordingly, novel therapies targeting the epigenome are being explored with the aim to restore normal DNA methylation patterns on oncogenes and tumor suppressor genes. A limited number of studies indicate that dietary compound resveratrol modulates DNA methylation of several cancer-related genes; however a complete view of changes in methylome by resveratrol has not been reported yet. In this study we performed a genome-wide survey of DNA methylation signatures in triple negative breast cancer cells exposed to resveratrol. Our data showed that resveratrol treatment for 24 h and 48 h decreased gene promoter hypermethylation and increased DNA hypomethylation. Of 2476 hypermethylated genes in control cells, 1,459 and 1,547 were differentially hypomethylated after 24 h and 48 h, respectively. Remarkably, resveratrol did not induce widespread non-specific DNA hyper- or hypomethylation as changes in methylation were found in only 12.5% of 27,728 CpG loci. Moreover, resveratrol restores the hypomethylated and hypermethylated status of key tumor suppressor genes and oncogenes, respectively. Importantly, the integrative analysis of methylome and transcriptome profiles in response to resveratrol showed that methylation alterations were concordant with changes in mRNA expression. Our findings reveal for the first time the impact of resveratrol on the methylome of breast cancer cells and identify novel potential targets for epigenetic therapy. We propose that resveratrol may be considered as a dietary epigenetic therapy which deserves further *in vivo* characterization.

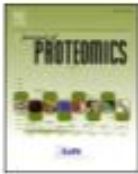
JPROT-01797; No of Pages 14

ARTICLE IN PRESS

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX–XXX


Available online at www.sciencedirect.com

www.elsevier.com/locate/jprot



Comparative proteomic profiling of triple-negative breast cancer reveals that up-regulation of RhoGDI-2 is associated to the inhibition of caspase 3 and caspase 9[☆]

Marcos A. Muñiz Lino^{a,1}, Yadira Palacios-Rodríguez^{a,1},
 Sergio Rodríguez-Cuevas^b, Verónica Bautista-Piña^b, Laurence A. Marchat^c,
 Erika Ruiz-García^d, Horacio Astudillo-de la Vega^e, Ana E. González-Santiago^f,
 Ali Flores-Pérez^g, José Díaz-Chávez^f, Ángeles Carlos-Reyes^g,
 Elizabeth Álvarez-Sánchez^g, César López-Camarillo^{g,*}

^aOncogenomics and Cancer Proteomics Laboratory, Autonomous University of Mexico City, Mexico
^bInstitute of Breast Diseases — FUCAM, Mexico City, Mexico
^cMolecular Biomedicine Program and Biotechnology Network, National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico
^dTranslational Medicine Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico
^eLaboratory of Translational Cancer Research and Cellular Therapy, Oncology Hospital, Medical Center Siglo XXI, Mexico City, Mexico
^fCardiogenesis Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico
^gLung Cancer Laboratory, National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
 Triple-negative breast cancer
 Proteomic profiling
 RhoGDI-2
 Apoptosis
 Mitochondrial dysfunction
 Caspases activation

ABSTRACT

There are no targeted therapeutic modalities for triple-negative breast cancer (TNBC), thus it is associated with poor prognosis and worst clinical outcome. Here, our aim was to identify deregulated proteins in TNBC with potential therapeutic applications. Proteomics profiling of TNBC and normal breast tissues through two-dimensional electrophoresis and ESI-MS/MS mass spectrometry revealed the existence of 16 proteins (RhoGDI-2, HSP27, SOD1, DFI, UBE2N, PSME1, PTL, SHERGL, and sPLA-1) with increased abundance in carcinomas. We also evidenced for the first time the deregulation of COX5, MTPN and D81 proteins in TNBC that may represent novel tumor markers. Particularly, we confirmed the overexpression of the Rho-GDP dissociation inhibitor 2 (RhoGDI-2) in distinct breast cancer subtypes, as well as in metastatic cell lines derived from lung, prostate, and breast cancer. Remarkably, targeted disruption of RhoGDI-2 by RNA interference induced mitochondrial dysfunction, and facilitated caspase-3 and -9 activation in two breast cancer cell lines. Moreover, suppression of RhoGDI-2 resulted in a robust sensitization of breast cancer cells to cisplatin therapy. In conclusion, we identified novel proteins deregulated in TNBC, and confirmed the overexpression of RhoGDI-2. We propose that RhoGDI-2 inhibition may be

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Proteomics, mass spectrometry and peptidomics, Cancer 2013.

^{*} Corresponding author at: San Lorenzo 290, Col del Valle, C.P. 01100, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 54886661.
 E-mail address: genomicas@yahoo.com.mx (C. López-Camarillo).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.019>
 1874-3914/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

microRNA-18b is upregulated in breast cancer and modulates genes involved in cell migration

MIGUEL A. FONSECA-SANCHEZ¹, CARLOS PÉREZ-PLASENCIA^{2,3}, JORGE FERNÁNDEZ-RETANA², ELENA ARECHAGA-OCAMPO⁴, LAURENCE A. MARCHAT⁵, SERGIO RODRÍGUEZ-CUEVAS⁶, VERÓNICA BAUTISTA-PIÑA⁶, ZAIRA E. ARELLANO-ANAYA¹, ALI FLORES-PÉREZ¹, JOSÉ DÍAZ-CHÁVEZ⁷ and CÉSAR LÓPEZ-CAMARILLO¹

¹Oncogenomics and Cancer Proteomics Laboratory, Genomics Sciences Program, Autonomous University of Mexico City, Mexico City; ²Oncogenomics Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City; ³Biomedicine Unit, Superior Studies Faculty-Iztacala, National University of Mexico, Mexico City; ⁴Virus and Cancer Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City; ⁵Molecular Biomedicine Program and Biotechnology Network, National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, Mexico City; ⁶Institute of Breast Diseases-FUCAM, Mexico City; ⁷Unit of Biomedical Research in Cancer, Institute of Biomedical Research, UNAM/National Cancer Institute, Mexico City, Mexico

Received June 28, 2013; Accepted August 2, 2013

DOI: 10.3892/or.2013.2691

Abstract. microRNAs are small non-coding RNAs of ~22 nucleotides that function at post-transcriptional level as negative regulators of gene expression. Aberrant expression of microRNAs could promote uncontrolled proliferation, migration and invasion of human cancer cells. In this study, we analyzed the expression of microRNA-18b (miR-18b) in breast cancer cell lines and in a set of clinical specimens. Our results showed that miR-18b was upregulated in four out of five breast cancer cell lines and also in breast tumors. In order to identify potential gene targets, we carried out transcriptional profiling of MDA-MB-231 breast cancer cells that ectopically expressed miR-18b. Our results showed that 263 genes were significantly modulated in miR-18b-deficient cells (fold change >1.5; P<0.05). We found that knock-down of miR-18b induced the upregulation of 55 olfactory receptor (OR) genes and nine genes (NLRP7, KLK3, OLFM3, POSTN, MAGED4R, KIR3DL3, CRX, SEMG1 and CEACAM5) with key roles in cell migration and metastasis. Consistently, we found that ectopic inhibition of miR-18b suppressed the migration of two breast cancer cell models *in vitro*. In conclusion, we have uncovered genes directly or indirectly modulated by

miR-18b which may represent potential therapeutic targets in breast cancer. Our data also pointed out a role of miR-18b in migration of breast cancer cells.

Introduction

microRNAs are small non-coding RNAs of ~22 nucleotides that function at post-transcriptional level as negative regulators of gene expression. In normal cells, microRNAs maintain a balance of key cellular processes including cell growth, proliferation, differentiation and cell death. Abnormal expression of microRNAs occurs frequently in breast cancer where they act as oncogenes and tumor-suppressors, microRNAs may contribute to tumor initiation and progression by inhibiting apoptosis and promoting uncontrolled proliferation, invasion and metastasis. In consequence, they represent potential prognostic markers and novel therapeutic targets in human cancer (1). In animal cells, microRNAs are frequently transcribed together as polycistronic primary transcripts that are processed into multiple individual mature microRNAs. Particularly, microRNA-18b (miR-18b) is located at chromosome X within the miR-106a-363 cluster that is constituted by six different microRNAs (2,3). It has been proposed that expression of this microRNAs cluster is undetectable or very low in mouse (4). Diverse reports associated the aberrant expression of miR-18b to diverse human pathologies including cardiac hypertrophy (5), multiple sclerosis (6) and hepatitis B virus chronic infection (7). In human cancer, miR-18b expression is also deregulated. It has been reported that miR-18b is highly expressed in gastric cancer (8), in malignant serous tumors from borderline and benign ovarian tumors (9), in basal cell carcinoma of the skin (10), and in colonic cancer (11). Some miR-18b targets have been experimentally identified. In stem-like cells isolated from glioblastoma, it

Correspondence to: Dr César López-Camarillo, Oncogenomics and Cancer Proteomics Laboratory, Genomics Sciences Program, Autonomous University of Mexico City, San Lorenzo 290, Cof del Valle, 03100 Mexico City, Mexico
E-mail: genomics@yahoo.com.mx

Key words: breast cancer, tumor marker, microRNA-18b, expression profiling, transcriptome, cell migration

Proteomic Profiling Reveals That Resveratrol Inhibits HSP27 Expression and Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Therapy

José Díaz-Chávez^{1*}, Miguel A. Fonseca-Sánchez^{2*}, Elena Arechaga-Ocampo³, Ali Flores-Pérez², Yadira Palacios-Rodríguez², Guadalupe Domínguez-Gómez¹, Laurence A. Marchat⁴, Lizeth Fuentes-Mera⁵, Guillermo Mendoza-Hernández⁶, Patricio Gariglio⁷, César López-Camarillo^{2*}

1 Carcinogenesis Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico, **2** Oncogenomics and Cancer Proteomics Laboratory, Genomics Sciences Program, Autonomous University of Mexico City, Mexico City, Mexico, **3** Virus and Cancer Laboratory, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico, **4** Molecular Biomedicine Program and Biotechnology Network, National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico, **5** Molecular Biology and Hemocompatibility Laboratory, General "Dr. Manuel Gónzalez" Hospital, Mexico City, Mexico, **6** Medicine Faculty, Autonomous National University of Mexico, Mexico City, Mexico, **7** Genetics and Molecular Biology Department, Centre of Research and Advances Studies, Mexico City, Mexico

Abstract

The use of chemopreventive natural compounds represents a promising strategy in the search for novel therapeutic agents in cancer. Resveratrol (3,4',5-tri-hydroxystilbene) is a dietary polyphenol found in fruits, vegetables and medicinal plants that exhibits chemopreventive and antitumor effects. In this study, we searched for modulated proteins with preventive or therapeutic potential in MCF-7 breast cancer cells exposed to resveratrol. Using two-dimensional electrophoresis we found significant changes (FC >2.0; $p \leq 0.05$) in the expression of 16 proteins in resveratrol-treated MCF-7 cells. Six down-regulated proteins were identified by tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) as heat shock protein 27 (HSP27), translationally-controlled tumor protein, peroxiredoxin-6, stress-induced-phosphoprotein-1, pyridoxine-5'-phosphate oxidase-1 and hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; whereas one up-regulated protein was identified as triosephosphate isomerase. Particularly, HSP27 overexpression has been associated to apoptosis inhibition and resistance of human cancer cells to therapy. Consistently, we demonstrated that resveratrol induces apoptosis in MCF-7 cells. Apoptosis was associated with a significant increase in mitochondrial permeability transition, cytochrome *c* release in cytoplasm, and caspases -3 and -9 independent cell death. Then, we evaluated the chemosensitization effect of increasing concentrations of resveratrol in combination with doxorubicin anti-neoplastic agent *in vitro*. We found that resveratrol effectively sensitizes MCF-7 cells to cytotoxic therapy. Next, we evaluated the relevance of HSP27 targeted inhibition in therapy effectiveness. Results evidenced that HSP27 inhibition using RNA interference enhances the cytotoxicity of doxorubicin. In conclusion, our data indicate that resveratrol may improve the therapeutic effects of doxorubicin in part by cell death induction. We propose that potential modulation of HSP27 levels using natural alternative agents, as resveratrol, may be an effective adjuvant in breast cancer therapy.

Citation: Díaz-Chávez J, Fonseca-Sánchez MA, Arechaga-Ocampo E, Flores-Pérez A, Palacios-Rodríguez Y, et al. (2013) Proteomic Profiling Reveals That Resveratrol Inhibits HSP27 Expression and Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Therapy. *PLOS ONE* 8(5): e64378. doi:10.1371/journal.pone.0064378

Editor: Partha Mukhopadhyay, National Institutes of Health, United States of America

Received: January 17, 2013; **Accepted:** April 11, 2013; **Published:** May 27, 2013

Copyright: © 2013 Díaz-Chávez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FORDEC SAUD 2009-01-112454 grant. Miguel A. Fonseca-Sánchez and Yadira Palacios-Rodríguez were supported by Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, Mexico (CYT-DF) (<http://www.conacyt.gob.mx/Paginas/Instituto.aspx>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: genomica@yahoo.com.mx

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide, accounting for 23% (1.38 million) of the total new cancer cases and 14% (485,000) of the total cancer deaths [1]. A large body of epidemiologic data supports the fact that diet and nutrition play a key role in carcinogenesis [2,3], as reflected in the global differences in breast cancer incidence worldwide [4]. High fat, meat-based and low fiber diets are associated to high breast cancer incidence rates whereas the lowest rates are typically observed in populations with mainly plant-based diets [5]. The high content of

phytoestrogens in these plant has been proposed as the underlying factor responsible for the low breast cancer incidence in these populations but the mechanisms are poorly understood [6,7]. One of these naturally occurring compounds is the resveratrol that has been suggested to have marked chemopreventive and chemotherapeutic properties. It is present in more than 72 plant species, including a wide variety of fruits and vegetables, such as grapes, berries, peanons, pines and various herbs [8,9]. The physiological function of resveratrol is to act as phytoalexin, a defensive agent protecting plants against adverse conditions such as pathogenic attack, mechanical injury, and environmental stressors [10]. In human, resveratrol exerts antitumor properties at inhibition,

IX. REFERENCIAS

1. <http://www.breastcancer.org/>.
2. Contran, R.S., V. Kumar, and T.R. Collons, *Patología estructural y funcional*. Madrid, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, 2000: p. 1058.
3. Masson, S., *Diccionario medico*. ANGIOLOGIA-BARCELONA-, 1999. 51: p. 145-145.
4. Devi, P.U., *Basics of carcinogenesis*. Health Adm, 2004. 17(1): p. 16-24.
5. Hennings, H., et al., *Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis*. Experimental Biology and Medicine, 1993. 202(1): p. 1-8.
6. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nature reviews genetics, 2002. 3(6): p. 415-428.
7. Yuspa, S.H. and M.C. Poirier, *Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade*. Advances in cancer research, 1988. 50: p. 25-70.
8. Goodson, W.H., et al., *Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead*. Carcinogenesis, 2015. 36(Suppl 1): p. S254-S296.
9. Pashin, Y.V. and L. Bakhitova, *Mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Environmental health perspectives, 1979. 30: p. 185.
10. Blumberg, P.M., *Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture*. Cancer research, 1988. 48(1): p. 1-8.
11. Roger, P.P., et al., *Stimulation of cell proliferation and inhibition of differentiation expression by tumor-promoting phorbol esters in dog thyroid cells in primary culture*. Cancer research, 1986. 46(2): p. 898-906.
12. Symonds, H., et al., *p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo*. Cell, 1994. 78(4): p. 703-711.

13. Hartmann, A., et al., *The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer*. Trends in Genetics, 1997. 13(1): p. 27-33.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
15. di Tomaso, E., et al., *PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment*. PLoS One, 2009. 4(4): p. e5123.
16. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes & development, 2008. 22(10): p. 1276-1312.
17. Abouantoun, T.J. and T.J. MacDonald, *Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor*. Molecular cancer therapeutics, 2009. 8(5): p. 1137-1147.
18. White, R.E., et al., *Transforming growth factor α transforms astrocytes to a growth-supportive phenotype after spinal cord injury*. The Journal of Neuroscience, 2011. 31(42): p. 15173-15187.
19. Le Cras, T.D., et al., *Inhibition of PI3K by PX-866 Prevents Transforming Growth Factor- α -Induced Pulmonary Fibrosis*. The American journal of pathology, 2010. 176(2): p. 679-686.
20. Dufour, C., et al., *Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-like State with Transforming Growth Factor Alpha Are Sensitized to Cancerous Transformation*. Stem Cells, 2009. 27(10): p. 2373-2382.
21. Sasaki, T., et al., *Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor α -epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model*. The American journal of pathology, 2008. 173(1): p. 205-216.

22. Lindeman, N.I., et al., *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. Journal of Thoracic Oncology, 2013. 8(7): p. 823-859.
23. Mehra, R., et al., *Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR-and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancer*. Drug Resistance Updates, 2011. 14(6): p. 260-279.
24. Hrustanovic, G., B.J. Lee, and T.G. Bivona, *Mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies*. Cancer biology & therapy, 2013. 14(4): p. 304-314.
25. Gordon, M., et al., *Assessment of HER2 gene amplification in adenocarcinomas of the stomach or gastroesophageal junction in the INT-0116/SWOG9008 clinical trial*. Annals of oncology, 2013: p. mdt106.
26. Ieni, A., et al., *HER2 status in premalignant, early, and advanced neoplastic lesions of the stomach*. Dis Markers, 2015. 234851.
27. Yu, D.-H., et al., *Oncogenic HER2 fusions in gastric cancer*. Journal of translational medicine, 2015. 13(1): p. 1.
28. Martin-Castillo, B., et al., *Basal/HER2 breast carcinomas: integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin)*. Cell Cycle, 2013. 12(2): p. 225-245.
29. Gajria, D. and S. Chandarlapaty, *HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies*. Expert review of anticancer therapy, 2011. 11(2): p. 263-275.
30. Nuciforo, P., et al., *Quantification of HER family receptors in breast cancer*. Breast Cancer Research, 2015. 17(1): p. 1.
31. Bunni, M.A., et al., *Role of integrins in angiotensin II-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. 300(3): p. C647-C656.

32. Desgrosellier, J.S. and D.A. Cheresh, *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nature Reviews Cancer, 2010. 10(1): p. 9-22.
33. Drosten, M., et al., *Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival*. The EMBO journal, 2010. 29(6): p. 1091-1104.
34. Cox, A.D. and C.J. Der, *Ras history: The saga continues*. Small GTPases, 2010. 1(1): p. 2-27.
35. Grabocka, E., et al., *Wild-type H-and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response*. Cancer cell, 2014. 25(2): p. 243-256.
36. Carrière, C., et al., *Deletion of Rb accelerates pancreatic carcinogenesis by oncogenic Kras and impairs senescence in premalignant lesions*. Gastroenterology, 2011. 141(3): p. 1091-1101.
37. Arima, Y., et al., *Induction of ZEB proteins by inactivation of RB protein is key determinant of mesenchymal phenotype of breast cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(11): p. 7896-7906.
38. Knudsen, E.S., et al., *RB loss contributes to aggressive tumor phenotypes in MYC-driven triple negative breast cancer*. Cell Cycle, 2015. 14(1): p. 109-122.
39. Burke, J.R., et al., *Multiple mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain*. Journal of molecular biology, 2014. 426(1): p. 245-255.
40. Hernández-Reséndiz, I., et al., *Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2015. 1853(12): p. 3266-3278.
41. Whitwell, J., et al., *Relationships between p53 status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines in vitro: implications for improving existing assays*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2015. 789: p. 7-27.

42. Barreca, A., et al., *Inter-and intratumoral heterogeneity of BCL2 correlates with IgH expression and prognosis in follicular lymphoma*. Blood cancer journal, 2014. 4(10): p. e249.
43. Correia, C., et al., *BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma*. Blood, 2015. 125(4): p. 658-667.
44. Yip, K. and J. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer*. Oncogene, 2008. 27(50): p. 6398-6406.
45. Adams, J. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. 26(9): p. 1324-1337.
46. Hsieh, J.-K., et al., *RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2*. Molecular cell, 1999. 3(2): p. 181-193.
47. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53*. Oncogene, 2003. 22(56): p. 9030-9040.
48. Tong, Z., et al., *miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L1 and MCL1*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015. 75: p. 129-136.
49. Basu, N., et al., *Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the GI tract*. Expert review of gastroenterology & hepatology, 2013. 7(8): p. 733-748.
50. Prescott, J., et al., *Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012. 730(1): p. 75-84.
51. Factor, P., *Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis*. The Journal of cell biology, 1995. 129(4): p. 895-898.
52. Beecken, W.-D.C., et al., *Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice*. Journal of the National Cancer Institute, 2001. 93(5): p. 382-387.
53. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. Vascular health and risk management, 2006. 2(3): p. 213.

54. Krock, B.L., N. Skuli, and M.C. Simon, *Hypoxia-induced angiogenesis good and evil*. Genes & cancer, 2011. 2(12): p. 1117-1133.
55. Lu, X. and Y. Kang, *Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis*. Clinical cancer research, 2010. 16(24): p. 5928-5935.
56. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacological reviews, 2004. 56(4): p. 549-580.
57. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2014. 15(3): p. 178.
58. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-674.
59. Alifano, M., et al., *Systemic inflammation, nutritional status and tumor immune microenvironment determine outcome of resected non-small cell lung cancer*. PLoS One, 2014. 9(9): p. e106914.
60. Anson, M., et al., *Oncogenic β -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice*. The Journal of clinical investigation, 2012. 122(2): p. 586-599.
61. Erreni, M., A. Mantovani, and P. Allavena, *Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer*. Cancer Microenvironment, 2011. 4(2): p. 141-154.
62. Ganapathy-Kanniappan, S. and J.-F.H. Geschwind, *Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects*. Molecular cancer, 2013. 12(1): p. 1.
63. Hammoudi, N., et al., *Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications*. Chinese journal of cancer, 2011. 30(8): p. 508.
64. Demetrius, L.A., J.F. Coy, and J.A. Tuszynski, *Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism*. Theoretical Biology and Medical Modelling, 2010. 7(1): p. 1.

65. Capparelli, C., et al., *Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis, via glycolysis and ketone production*. *Cell Cycle*, 2012. 11(12): p. 2285-2302.
66. O'Sullivan, T., et al., *Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity*. *The Journal of experimental medicine*, 2012. 209(10): p. 1869-1882.
67. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape*. *Current opinion in immunology*, 2014. 27: p. 16-25.
68. Reiman, J.M., et al. *Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression*. in *Seminars in cancer biology*. 2007: Elsevier.
69. *CancerStats: Worldwide cancer*. London: Cancer Research UK. Fact sheet 2005. 297.
70. Lozano, R., et al., *Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006*. *Observatorio de la Salud*. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.
71. Knaul, F.M., et al., *Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante*. *Salud pública de México*, 2009. 51: p. s335-s344.
72. Ross, J.S. and G.N. Hortobagyi, *Molecular oncology of breast cancer*. 2005: Jones & Bartlett Learning.
73. Lynch, H.T., et al., *Hereditary breast cancer and family cancer syndromes*. *World journal of surgery*, 1994. 18(1): p. 21-31.
74. Berezikov, E., et al., *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*. *Cell*, 2005. 120(1): p. 21-24.
75. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 350-355.
76. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 828-833.

77. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(9): p. 2999-3004.
78. Park, S.-M., et al., *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2*. Genes & development, 2008. 22(7): p. 894-907.
79. Huang, Q., et al., *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. Nature cell biology, 2008. 10(2): p. 202-210.
80. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. Nature, 2007. 449(7163): p. 682-688.
81. Zhu, S., et al., *MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)*. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(19): p. 14328-14336.
82. Frankel, L.B., et al., *Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(2): p. 1026-1033.
83. Hossain, A., M.T. Kuo, and G.F. Saunders, *Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA*. Molecular and cellular biology, 2006. 26(21): p. 8191-8201.
84. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. Nature, 2008. 451(7175): p. 147-152.
85. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. 432(7014): p. 231-235.
86. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. 432(7014): p. 235-240.
87. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. 303(5654): p. 95-98.

88. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. 436(7051): p. 740-744.
89. Rand, T.A., et al., *Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation*. *Cell*, 2005. 123(4): p. 621-629.
90. Jakymiw, A., et al., *Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference*. *Nature cell biology*, 2005. 7(12): p. 1267-1274.
91. Huang, J., et al., *MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation*. *Stem Cells*, 2010. 28(2): p. 357-364.
92. Chung, T., et al., *Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1*. *International Journal of Cancer*, 2012. 130(5): p. 1036-1045.
93. Courboulain, A., et al., *Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension*. *The Journal of experimental medicine*, 2011. 208(3): p. 535-548.
94. Lam, E., et al., *A microRNA contribution to aberrant Ras activation in gastric cancer*. *Am J Transl Res*, 2011. 3(2): p. 209-218.
95. Liu, X.-H., et al., *Angiopoietin-1 targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of esophageal cancer*. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2008. 14(10): p. 1575.
96. Huang, J., et al., *Angiopoietin-I/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade*. *International journal of oncology*, 2009. 34(1): p. 79.
97. Moon, W.S., et al., *Expression of angiopoietin 1, 2 and their common receptor Tie2 in human gastric carcinoma: implication for angiogenesis*. *Journal of Korean medical science*, 2006. 21(2): p. 272-278.
98. Saharinen, P. and K. Alitalo, *The yin, the yang, and the angiopoietin-1*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. 121(6): p. 2157-2159.

99. Sasaki, H., et al., *Angiopoietin-like protein ANGPTL2 gene expression is correlated with lymph node metastasis in lung cancer*. *Oncology letters*, 2012. 4(6): p. 1325-1328.
100. Bertolino, P., et al., *Transforming growth factor- β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders*. *CHEST Journal*, 2005. 128(6_suppl): p. 585S-590S.
101. Sizemore, S.T. and R.A. Keri, *The forkhead box transcription factor FOXC1 promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7 (MMP7) expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(29): p. 24631-24640.
102. Siegenthaler, J.A., et al., *Foxc1 is required by pericytes during fetal brain angiogenesis*. *Biology open*, 2013. 2(7): p. 647-659.
103. Bao, W., et al., *A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells*. *Molecular cancer*, 2013. 12(1): p. 1.
104. Chen, Z., et al., *miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death*. *Molecular cancer*, 2013. 12(1): p. 1.
105. Imam, J.S., et al., *Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization*. *PLoS One*, 2012. 7(12): p. e52397.
106. Mikhaylova, O., et al., *VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma*. *Cancer cell*, 2012. 21(4): p. 532-546.
107. Zhang, L., X. Wang, and P. Chen, *MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells*. *BMC cancer*, 2013. 13(1): p. 1.
108. Ying, Z., et al., *Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype*. *Cancer research*, 2013. 73(2): p. 990-999.

109. Sacconi, A., et al., *miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer*. Cell death & disease, 2012. 3(11): p. e423.
110. Potus, F., et al., *Vascular remodeling process in pulmonary arterial hypertension, with focus on miR-204 and miR-126 (2013 Grover Conference series)*. Vascular, 2014. 4(2).
111. Kather, J.N., et al., *Angiopoietin-1 Is Regulated by miR-204 and Contributes to Corneal Neovascularization in KLEIP-Deficient Mice* *Angiopoietin-1 in Corneal Neovascularization*. Investigative ophthalmology & visual science, 2014. 55(7): p. 4295-4303.

X.ANEXOS

Genes sobreexpresados por el miR204 en cáncer de mama.

Symbol	Name	Prueba de T (valor de P)	Fold
CCDC172	Coiled-coil domain containing 172	0.00696597	5.20172419
REXO1L1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)-like 1	0.00238911	5.1260715
ZNF135	Zinc finger protein 135	0.01855646	3.93587357
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	0.00070511	3.83975957
FLJBR	CDNA FLJ42850 fis, clone BRHIP2005600	0.00555113	3.69055017
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	0.04631794	3.62557996
WFDC10B	WAP four-disulfide core domain 10B	0.03478569	3.61644613
PTPRN	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	0.01753148	3.54110366
RET	Ret proto-oncogene	0.02008878	3.45506804
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	0.00529609	3.43206827
OR2T8	Olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 8	0.04941593	3.39736786
GDF15	Growth differentiation factor 15	0.03859441	3.30108035
STAC2	SH3 and cysteine rich domain 2	0.04916317	3.23949948
ABCA13	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13	0.01082366	3.22308578
GPMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0.03116311	3.20371829
FAM138D	Family with sequence similarity 138, member D	0.03769324	3.13401664
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	0.03827357	3.11883274
DDIT4L	DNA-damage-inducible transcript 4-like	0.01656747	3.08650079
C6orf223	Chromosome 6 open reading frame 223	0.0307617	3.06934841

GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0.02258429	3.05919347
GDPD4	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 4	0.00961139	3.01689149
GAGE12F	G antigen 12F	0.01010901	3.00876961
GAGE12F	G antigen 12F	0.00562057	2.99224502
DERL3	Derlin 3	0.04992802	2.98593047
PTCH1	Patched 1	0.00304682	2.91963706
FGA	Fibrinogen alpha chain	0.04755874	2.88448397
ADRA1A	Adrenoceptor alpha 1A	0.01396583	2.85980129
ACP5	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	0.00823798	2.84207566
CREB3L3	CAMP responsive element binding protein 3-like 3	0.04477669	2.8347413
DLG2	Discs, large homolog 2 (Drosophila)	0.00839316	2.82438632
SCRT1	Scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)	0.047673	2.79856349
NUPR1	Nuclear protein, transcriptional regulator, 1	0.04038305	2.77753365
C1orf54	Chromosome 1 open reading frame 54	0.04900484	2.75373971
C6orf223	Chromosome 6 open reading frame 223	0.03123124	2.74518965
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	0.0455782	2.74071729
PPARGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	0.03114569	2.73606488
TMEM45A	Transmembrane protein 45A	0.03545377	2.72178396
GYPB	Glycophorin B (MNS blood group)	0.02467538	2.71584106
KIR2DS4	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	0.04264897	2.69198851
AMY1C	Amylase, alpha 1C (salivary)	0.04736774	2.67827181

OR8G2	Olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2	0.03153219	2.65390805
CLEC4G	C-type lectin domain family 4, member G	0.03451094	2.63719293
SLC14A1	Solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	0.01845188	2.62699907
SLC38A5	Solute carrier family 38, member 5	0.00246784	2.62526553
CLRN1	Clarin 1	0.04118883	2.61652657
AMY2B	Amylase, alpha 2B (pancreatic)	0.02683358	2.59388948
DEFB126	Defensin, beta 126	0.0200672	2.55339506
ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2	0.00025236	2.54682121
KCNC3	Potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	0.04718422	2.54566669
LOC100652930	Uncharacterized LOC100652930	0.0082149	2.51676289
OR111	Olfactory receptor, family 1, subfamily I, member 1	0.03045175	2.4782506
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	0.01351043	2.45426641
FAM27C	Family with sequence similarity 27, member C	0.03813113	2.45165099
FN1	Fibronectin 1	0.03782242	2.44226238
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	0.02602447	2.42671223
	CDNA FLJ43972 fis, clone TESTI4017961	0.04717068	2.39663209
SIK1	Salt-inducible kinase 1	0.0402354	2.39560904
EGR3	Early growth response 3	0.01183568	2.35712759
PPARGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	0.02222405	2.35225567
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.02687598	2.34729049
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	0.03373543	2.33868797
C1orf158	Chromosome 1 open	0.0091657	2.33099822

	reading frame 158		
ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2	0.01311437	2.33083926
FER1L4	Fer-1-like 4 (C. elegans) pseudogene	0.04208297	2.32360393
TMPRSS3	Transmembrane protease, serine 3	0.02460049	2.32007909
GDF15	Growth differentiation factor 15	0.00296277	2.29873601
ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	0.00060385	2.29544555
FAM198B	Family with sequence similarity 198, member B	0.03798781	2.29331335
LOC100131726	HCC-related HCC-C11_v3	0.0491068	2.29036995
FAM13C	Family with sequence similarity 13, member C	0.04082211	2.27502631
CMAS	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase	0.02721745	2.26515346
C3orf67	Chromosome 3 open reading frame 67	0.01612892	2.26064275
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	0.04311338	2.24986627
ARG1	Arginase, liver	0.04117785	2.1989997
ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	0.00410723	2.19292137
SSX3	Synovial sarcoma, X breakpoint 3	0.02293472	2.19128443
STK32B	Serine/threonine kinase 32B	0.01852134	2.17201261
AMY1C	Amylase, alpha 1C (salivary)	0.00604537	2.15996543
CA11	Carbonic anhydrase XI	0.01374889	2.12160792
DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	0.00722891	2.11536291
MSMB	Microseminoprotein, beta-	0.02409077	2.11368571
DHRS3	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	0.00677688	2.09841114
SLC2A3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0.03059882	2.08775994

IL6R	Interleukin 6 receptor	0.04939383	2.070948
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	0.01387352	2.06775497
TMPRSS6	Transmembrane protease, serine 6	0.01594894	2.05497406
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.01364524	2.05242511
SYNGR3	Synaptogyrin 3	0.03446485	2.04950104
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.00535057	2.04549025
CREB3L3	CAMP responsive element binding protein 3-like 3	0.00586538	2.03739549
SLC17A2	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2	0.00263211	2.02559884
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	0.01240994	2.02360048
GAGE2C	G antigen 2C	0.01089409	2.01435313
PKD1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	0.0487607	2.00545296
DDX26B	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B	0.00274434	1.98410047
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	0.04078305	1.98339181
C11orf65	Chromosome 11 open reading frame 65	0.04591208	1.98310746
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.00182228	1.98226561
EGLN3	Egl nine homolog 3 (C. elegans)	0.02720443	1.97519011
RHOB	Ras homolog family member B	0.00351684	1.96579344
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	0.02388527	1.96415721
CYTIP	Cytohesin 1 interacting protein	0.01377565	1.95493223
CAPZA3	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3	0.00334856	1.95286136
CFHR1	Complement factor H-related 1	0.00298094	1.93896094

MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.00535314	1.93483287
GSTM3	Glutathione S-transferase mu 3 (brain)	0.02852366	1.93452352
RHOB	Ras homolog family member B	0.0077349	1.92768196
PNPLA4	Patatin-like phospholipase domain containing 4	0.0004803	1.9227528
NEUROD2	Neuronal differentiation 2	0.02591918	1.91781619
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	0.01335116	1.91172982
LRRC36	Leucine rich repeat containing 36	0.04776547	1.91052701
NEUROD1	Neuronal differentiation 1	0.00248967	1.90047815
SCGB3A1	Secretoglobin, family 3A, member 1	0.03869957	1.89787247
POF1B	Premature ovarian failure, 1B	0.03672474	1.89661297
BTG4	B-cell translocation gene 4	0.01693236	1.88931126
LTBP1	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	0.01483995	1.88308807
KLRC4	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	0.0197866	1.8814994
TJP3	Tight junction protein 3	0.01766004	1.877513
GDPD1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	0.03579513	1.87584159
CSHL1	Chorionic somatomammotropin hormone-like 1	0.00453234	1.87384497
DLEU7	Deleted in lymphocytic leukemia, 7	0.01125986	1.87253909
CYP21A2	Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2	0.02949898	1.86607387
S100A7	S100 calcium binding protein A7	0.03476931	1.8591294
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	0.01726115	1.85478992
PDE4C	Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific	0.04483629	1.84960676

PTPRH	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	0.00414792	1.8486663
SIK1	Salt-inducible kinase 1	0.01984107	1.83963048
LINC00313	Long intergenic non-protein coding RNA 313	0.02090823	1.83632801
SLC2A5	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	0.00458353	1.83437189
PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	0.01908139	1.82676132
PTPRH	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	0.00804172	1.82191855
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	0.01610028	1.81960812
RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	0.0237564	1.81424157
ZMYND10	Zinc finger, MYND-type containing 10	0.00213382	1.80808133
RTP2	Receptor (chemosensory) transporter protein 2	0.02556782	1.80170283
SCNN1A	Sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit	0.01810527	1.79766386
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	0.00225061	1.79722536
PLIN1	Perilipin 1	0.02976123	1.79679995
PNCK	Pregnancy up-regulated non-ubiquitously expressed CaM kinase	0.01177699	1.79677291
HBZ	Hemoglobin, zeta	0.02211756	1.79624995
C9orf106	Chromosome 9 open reading frame 106	0.01021047	1.78917746
ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	0.00256162	1.78761883
CREBRF	CREB3 regulatory factor	0.01287808	1.78747044
SPN	Sialophorin	0.02704354	1.78101446
MUC1	Mucin 1, cell surface	0.00330168	1.77783745

	associated		
TMEM204	Transmembrane protein 204	3.2319E-05	1.76835018
SELPLG	Selectin P ligand	0.02955734	1.76425308
SPNS2	Spinster homolog 2 (Drosophila)	0.01984228	1.76149356
FCN3	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 3 (Hakata antigen)	0.00330704	1.75622447
KLK2	Kallikrein-related peptidase 2	0.02560653	1.75479237
ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5	0.04982487	1.75454222
SLC7A4	Solute carrier family 7 (orphan transporter), member 4	0.04085796	1.75261139
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	0.02890902	1.7500847
WDR81	WD repeat domain 81	0.03456336	1.74931737
TRMT10B	TRNA methyltransferase 10 homolog B (S. cerevisiae)	0.016557	1.74782135
FAM13A	Family with sequence similarity 13, member A	0.04913458	1.74708985
DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	0.02007923	1.74009701
LOC100130654	Uncharacterized LOC100130654	0.01752341	1.73881512
DHDH	Dihydrodiol dehydrogenase (dimeric)	0.01821003	1.72905172
RAP1GAP2	RAP1 GTPase activating protein 2	0.03809953	1.72757213
IZUMO4	IZUMO family member 4	0.0336721	1.72332503
PROS1	Protein S (alpha)	0.00321083	1.71995761
DUX4	Double homeobox 4	0.00909923	1.70962941
FSD1L	Fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	0.04335835	1.69574151
SEMA4G	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane	0.04213445	1.69122036

	domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4G		
GALR2	Galanin receptor 2	0.04677826	1.68444486
C1R	Complement component 1, r subcomponent	0.02717979	1.68329315
PAGE5	P antigen family, member 5 (prostate associated)	0.0499188	1.68210669
VMO1	Vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken)	0.00720627	1.67152241
PCDHB10	Protocadherin beta 10	0.00731582	1.67003028
KLRC1	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	0.01930772	1.66941195
MFNG	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0.01273333	1.66609729
HILPDA	Hypoxia inducible lipid droplet-associated	0.00794563	1.66475022
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	0.04522566	1.66106439
MIOX	Myo-inositol oxygenase	0.02136389	1.65779893
PDE9A	Phosphodiesterase 9A	0.04184324	1.65349778
GLIPR1L2	GLI pathogenesis-related 1 like 2	0.02717746	1.65211836
TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	0.04039778	1.64845326
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.01352263	1.64616059
OR10H3	Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3	0.02457768	1.64389618
TLR7	Toll-like receptor 7	0.02748314	1.64345986
PROM2	Prominin 2	0.03489272	1.64254422
SSPN	Sarcospan	0.005556	1.64057782
CD37	CD37 molecule	0.04940568	1.6355979
PLA2R1	Phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	0.03485764	1.63395429
FN1	Fibronectin 1	0.03116772	1.62997575
MPI	Mannose phosphate isomerase	0.03685495	1.62878116
CLEC2B	C-type lectin domain	0.0044977	1.61894162

	family 2, member B		
VCX	Variable charge, X-linked	0.03649286	1.612613
C17orf107	Chromosome 17 open reading frame 107	0.01552304	1.61091284
LRRC23	Leucine rich repeat containing 23	0.03719916	1.60429133
LAMA5	Laminin, alpha 5	0.02900047	1.60210769
HYAL1	Hyaluronoglucosaminidase 1	0.01230019	1.6011848
OR52E2	Olfactory receptor, family 52, subfamily E, member 2	0.02713902	1.60024169
TTC25	Tetratricopeptide repeat domain 25	0.00820778	1.59867624
KISS1R	KISS1 receptor	0.00611794	1.59388998
LZTFL1	Leucine zipper transcription factor-like 1	0.02186386	1.58512294
FN1	Fibronectin 1	0.00246164	1.56372026
CD72	CD72 molecule	0.01058573	1.56178506
C8orf31	Chromosome 8 open reading frame 31	0.02891658	1.55776524
RNF144A	Ring finger protein 144A	0.02522718	1.55149837
CILP2	Cartilage intermediate layer protein 2	0.02404592	1.54803856
SPTB	Spectrin, beta, erythrocytic	0.02323292	1.54740631
TMEM91	Transmembrane protein 91	0.00866993	1.54576492
TPK1	Thiamin pyrophosphokinase 1	0.02295915	1.54546225
ARMC12	Armadillo repeat containing 12	0.00942162	1.54371167
MYH4	Myosin, heavy chain 4, skeletal muscle	0.00717661	1.54198696
SPRY1	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	0.00476887	1.53996809
BHLHE41	Basic helix-loop-helix family, member e41	0.04380781	1.53991575
SPATA31D4	SPATA31 subfamily D, member 4	0.02589025	1.53971577
TRIM42	Tripartite motif containing 42	0.04000353	1.53615128
HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic),	0.02730456	1.53310805

	class A member 1		
C3orf67	Chromosome 3 open reading frame 67	0.04863703	1.53308889
TOB2P1	Transducer of ERBB2, 2 pseudogene 1	0.00382733	1.52994093
KNDC1	Kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1	0.03664319	1.52863565
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1	0.02669164	1.52313852
EFCAB3	EF-hand calcium binding domain 3	0.02666472	1.52182342
GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa	0.04739524	1.52181066
OPTC	Opticin	0.02993874	1.5198954
ANKRD37	Ankyrin repeat domain 37	0.03688264	1.51900456
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	0.01683414	1.51633038
ARHGAP25	Rho GTPase activating protein 25	0.04565064	1.5132911
PADI3	Peptidyl arginine deiminase, type III	0.0127165	1.51288896
APC	Adenomatous polyposis coli	0.02882753	1.51163312
KLRC1	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	0.01334686	1.50941629
ANKRD12	Ankyrin repeat domain 12	0.01197093	1.50673494
TCP11L2	T-complex 11, testis-specific-like 2	0.03220526	1.50338953
B3GNT3	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	0.04382586	1.50159366

APÉNDICE (soluciones y medios de cultivo).

LB:

10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, Agua c.b.p. 1 L. Se ajusta el pH a 7.5. Se esteriliza por autoclave.

DMEM, SFB 10%, PIS_t (100 ml):

90 ml de Gluta-MAX-I (DMEM, alto glucosa y glutamina, Invitrogen), 10 ml de Suero fetal bovino (Invitrogen), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C y 1 ml de solución de Penicilina (10.000 U/ml)-Estreptomicina (10.000 ug/ml), (HyClone).

Amortiguador de carga para proteínas (2X):

2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2ml de glicerol, 200 ug de β-mercaptoetanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 ml. pH 6.8.

Amortiguador de corrida para electroforesis de proteínas:

Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 1%.

TAE (50X):

242 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 37.2 g de Na₂EDTA.2H₂O. Agua c.b.p. 1 L.

TBE (10X):

108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 40 ml 0.5 M de EDTA pH 8. Agua c.b.p.1L.

TE:

Tris.Cl 10 mM, pH 7.4 y EDTA 1 mM pH 8.0.

Solución bloqueadora para Western blot:

5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4

Amortiguador de transferencia (1X):

Tris (0.025 M), glicina (0.192 M), 20 % de metanol.

Amortiguadores para la obtención de extractos totales:

TNTE: 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA

PBS pH 7.4: NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaH₂PO₄·12H₂O 6.47 mM y KCl 2.68 mM.

Solución de Azul de Coomasie (1 L):

Coomasie R-250 al 0.25%, 500 ml de metanol y 70 ml de ácido acético. Agua c.b.p.1L.

Solución desteñidora:

Etanol 30 %, ácido acético 10 % y Agua bidestilada 60%.

Reactivo de Bradford:

50 mg de Azul de Coomasie G-250, 25 ml de etanol al 100%, 50 ml de ácido fosfórico al 85 % y 500 ml de agua bidestilada. La solución se filtra con papel Whatman No. 1.

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 ₂ 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 µl	25 µl	25 µl
Volumen final	45 ml	45 ml	45 ml

	Gel Concentrador
Soluciones	3%
Acrilamida/Bis (30%:0.8%)	2.2 ml
0.5 M Tris pH 6.8	4.9 ml
dH ₂ O	12.5 ml
SDS 10%	0.2 ml
APS 10%	0.25 ml
Temed	15 μ 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.

TEMED (Tetrametiletilendiamina): Almacenar a 4°C

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

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 ₂)
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 ₂ O libre de nucleasas	Aforar a 24 µl	
Total=	24 µl	
Añadir	+1 µl DNA (200 ng)	
Volumen final =	25 µl	
Controles :	Negativo	1 µl H ₂ 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_m ≥ 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.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 13 de Diciembre de 2016, en la Ciudad de México. Para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Jose Ali Flores Perez.

Dr. César López Camarillo

Dra. Elena Arechaga Ocampo

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dra. Rosa Martha E. Yocupicio Monroy

Dra. Itzel López Rosas
